

Untersuchungen über die
Pigmentbildung bei *Micrococcus aureus*
und *Serratia marcescens*

Margarete Goerigk

Aus dem Tierhygienischen Institut der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. M e y n

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE PIGMENTBILDUNG
BEI MICROCOCCUS AUREUS UND SERRATIA MARCESCENS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Margarete Goerigk

München 1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Z i p f

Referent: Professor Dr. A. M e y n

Tag der Promotion: 26. 2. 1960

"UNI"-Druck, München 13, Amalienstr. 85

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINFÜHRUNG

1. ALLGEMEINE BEMERKUNGEN

a. Zielsetzung, Bedeutung, Zwecksetzung

1. Zielsetzung

2. Bedeutung

b. Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchung

c. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

1. Zielsetzung

2. Bedeutung

3. Zusammenfassung

4. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

5. Zusammenfassung

6. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

7. Zusammenfassung

8. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

MEINER MUTTER

1. Zielsetzung

2. Bedeutung

3. Zusammenfassung

4. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

5. Zusammenfassung

6. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

7. Zusammenfassung

8. Die Bedeutung der Untersuchung für die Praxis

9. Zusammenfassung

C. ZUSAMMENFASSUNG

1. Zielsetzung

2. Bedeutung

3. Zusammenfassung

d. Zusammenfassung

1. Zielsetzung

2. Bedeutung

3. Zusammenfassung

e. Zusammenfassung

1. Zielsetzung

2. Bedeutung

3. Zusammenfassung

D. ZUSAMMENFASSUNG

E. ANHANG

F. LITERATUR

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG	
B. BESPRECHUNG DES SCHRIFTTUMS	2
I. Geschichte, Nomenklatur, Morphologie	2
a) <i>Micrococcus aureus</i>	2
b) <i>Serratia marcescens</i>	2
II. Allgemeines über die Pigmentbildung bei Bakterien	5
III. Die Pigmentbildung bei <u><i>Micrococcus aureus</i></u>	6
a) Allgemeines	6
b) Der Einfluß von Sauerstoff und Temperatur auf die Farbstoffbildung	7
c) Der Einfluß von Licht auf die Farbstoffbildung	8
d) Der Einfluß der Nährbodenzusammensetzung auf die Farbstoffproduktion	9
e) Chemie des Zeaxanthins (Pigment von <i>Micrococcus aureus</i>)	10
IV. Die Pigmentbildung bei <u><i>Serratia marcescens</i></u>	12
a) Sitz der Pigmente	12
b) Der Einfluß von Sauerstoff und Temperatur auf die Farbstoffbildung	13
c) Der Einfluß von Licht auf die Farbstoffbildung	14
d) Der Einfluß der Nährbodenzusammensetzung und des pH- Wertes auf die Farbstoffproduktion	15
e) Sonstige Beeinflussung der Farbstoffbildung	19
f) Chemie des Prodigiosins (Pigment von <i>Serratia marcescens</i>)	21
C. EIGENE VERSUCHE	23
I. Material und Methodik	23
a) <i>Micrococcus aureus</i>	23
b) <i>Serratia marcescens</i>	
II. Untersuchungsergebnisse	24
a) <i>Micrococcus aureus</i>	24
b) <i>Serratia marcescens</i>	33
III. Diskussion	35
a) <i>Micrococcus aureus</i>	35
b) <i>Serratia marcescens</i>	36
D. ZUSAMMENFASSUNG	38
E. SCHRIFTTUM	39
Lebenslauf	

A. EINLEITUNG

Farbstoffbildende Mikroorganismen sind schon seit dem Altertum bekannt. Doch kein Pigmentbildner hat bis auf die heutige Zeit so weitreichende Aufmerksamkeit erregt und keinem ist so großes Interesse entgegengebracht worden wie dem "Wunderbacillus", der früher als *Bacterium prodigiosum*, heute als *Serratia marcescens* (Bizio) bezeichnet wird. Unter günstigen Bedingungen entwickelt dieser Keim ein prächtiges rotes Pigment und wegen seines starken O_2 -Verbrauches bietet er eine bequeme Methode der Anaerobierzüchtung durch das Symbioseverfahren nach F o r t n e r .

Allgemein bekannt sind auch die Farbnuancen der Staphylokokken, die weiß, zitronengelb und goldgelb wachsen. Es gibt aber auch Kokken, die als Sarrinen bezeichnet werden und speziell den Käseteig rot färben. Wie Stocker, 1955, feststellte, tritt jedoch die Färbung in diesem Falle nicht ohne weiteres ein, sondern erst Aneurin (Vitamin B_1) ist imstande, die Bildung des roten Farbstoffes zu veranlassen.

Diese Tatsachen veranlaßten Herrn Prof. Dr. M e y n, Untersuchungen darüber anstellen zu lassen, unter welchen Bedingungen bei *Micrococcus aureus* und *Serratia marcescens* die Farbstoffproduktion am besten in Erscheinung tritt.

B. BESPRECHUNG DES SCHRIFTTUMS

I. GESCHICHTE, NOMENKLATUR, MORPHOLOGIE

a) *Micrococcus aureus*

Im Jahre 1878 sah Robert Koch zuerst Mikrokokken im Eiter. Pasteur brachte die Keime 1880 in Nährbrühe zur Vermehrung. Der schottische Chirurg Ogston in Aberdeen fand dann 1881 regelmäßig Kokken in Abszessen, die oft traubenförmig aussahen (Staphyle = Weintraube) und prägte im Jahre 1882 den Namen Staphylococcus.

Völlige Klarheit jedoch schaffte erst der Göttinger Poliklinik-Chirurg Rosenbach 1884. Durch Reinkultur auf festen Nährböden und durch Tierversuch wies er die im Eiter gesehenen Kokken als verschiedene Arten nach. Und es wurde durch ihn bekannt, daß diese Bakterien ubiquitär und pathogen sind.

Rosenbach, 1884, prägte den Namen Staphylococcus pyogenes aureus. Da Da nach den Nomenklaturregeln nur eine "binäre" Bezeichnung zulässig ist, heißt die Art jetzt Staphylococcus aureus, oder nach internationaler Nomenklatur Micrococcus pyogenes, var. aureus.

Nach Migula, 1900, und Müller, 1950, handelt es sich um kugelige Zellen von durchschnittlich $0,9\mu$ Größe, die oft in Diplococcenform vorkommen. In Kulturen sieht man die Keime zu traubigen Gebilden geordnet, während im Gewebe regellose Haufen vorliegen.

Der *Micrococcus aureus* ist grampositiv und unbeweglich

b) *Serratia marcescens* Bizio

Die Geschichte dieses Keimes ist nicht nur für die Spezialwissenschaft von Wichtigkeit, sondern auch von kulturhistorischer Bedeutung.

Da für *Serratia marcescens* auf stärkehaltigen Nährböden die günstigsten Bedingungen zu seinem Wachstum geboten sind, siedelt sich der Keim mit Vorliebe auf Brot, Oblaten, Kartoffeln (gekocht), Kleister usw. an. Er bildet blutrote Überzüge oder blutstropfenartige Kolonien. So ist es auch zu erklären, daß sich in der Geschichte, schon im Altertum, zahlreiche Berichte über eine Umwandlung von Speisen in Blut finden. Im Mittelalter gab dieser Mikroorga-

nismus zu allerlei Aberglauben und infolgedessen zu den grausamsten Verfolgungen Veranlassung.

So war z.B. den Pythagoräern verboten, Bohnen zu essen. Lucian läßt in einem seiner Dialoge den Pythagoras als Grund dieses Verbots seinen Schülern die Beobachtung angeben, daß gekochte weiße Bohnen, einige Zeit dem Mondschein ausgesetzt, sich in Blut verwandeln. Diese Lehre vom Verbot des Bohnengenusses bestand auch bei den ägyptischen Priestern.

Erste geschichtliche Mitteilungen über diesen Keim gehen nach Ehrenberg (zit. nach Scheurlen, 1896) zurück bis in das Jahr 332 v.Chr. Geburt, "einem Pestjahre, in dem zu Rom 170 Matronen wegen absichtlicher Vergiftung des Volkes hingerichtet wurden." In demselben Jahre unterstützte dieser Keim Alexander den Großen bei der Eroberung von Tyros in Phönikien. Als das Brot seiner Soldaten eines Tages beim Auseinanderbrechen ein blutiges Aussehen zeigte, beruhigten Priester das erschreckte Heer mit der Erklärung, daß das Blut innen sei, werde es den Eingeschlossenen blutig ergehen. So sorgte Alexander der Große dafür, daß dies als unglückverheißend für die Belagerten gedeutet wurde, also glückverheißend für sein eigenes Heer. (Curtius Rufus: "Alexandri Magni, Regis Macedonium", Buch IV, 1852).

Hostien, amylnmreich und säurefrei, waren für *Serratia marcescens* ebenfalls ein besonders günstiger Nährboden. 1369 sah man in der Brüsseler Gegend "Blutflecken" auf Hostien. Das Volk glaubte, die Hostien seien von Juden durch Nadelstiche zum Bluten gebracht worden. Die Täter wurden rasch gefunden und meist verbrannt oder einfach totgeschlagen.

Die Zahl der Exekutionen, verursacht durch diesen Mikroorganismus war so groß, daß Scheurlen, 1896, schreibt, dieser Saprophyt habe mehr Menschen umgebracht als mancher pathogene *Bacillus*.

Die letzten Vorkommnisse ereigneten sich im 19. Jahrhundert. Im Jahre 1819 zeigten sich in Legnaro bei Padua, Italien, im Hause eines Bauern blutrote Flecken auf einer Schüssel voll Polenta (Maisbrei). Am folgenden Tage, als das Phänomen nicht bloß an der Polenta sondern auch an anderen Lebensmitteln (Reissuppe, Zwieback) auftrat, liefen die entsetzten Bewohner zum Pfarrer, der durch Beschwören die Sache zu bannen suchte. Der Distriksarzt von Piove, Dr. Sette, wurde aufgefordert, eine Untersuchung durchzuführen. Dieser erkannte sofort, daß es sich hier um eine Art Pilzbildung handle und konnte der Kommission, die nach Legnaro gekommen war und die sich aus Ärzten und Professoren der Universität Padua zusammensetzte, dementsprechend berichten.

Auch 1825 erregte in Enkirch-Mosel in einer Mühle blutrotes feuchtes Mehl Schrecken.

Der Apotheker B i z i o in Padua untersuchte 1823 als erster blutrote Flecke auf Maisbrei (Polenta) mit Hilfe eines der damaligen Mikroskope. Was wir Kolonien nennen, das faßte er als "stengellose Pilzköpfchen" auf, die er zu Ehren seines Physiklehrers Serrati sowie wegen ihrer Weichheit und Zerfließlichkeit Serratia marcescens nannte (marcescens = weich, zerfließend).

Inzwischen hatte S e t t e ebenfalls über die Epidemie in Legnaro berichtet und dem Organismus 1824 den Namen Zoogalactina imetrophia gegeben.

Im Jahre 1848 gelangte der Keim in den Besitz Ehrenbergs. Dieser züchtete ihn auf verschiedenen Nährböden und beschrieb ihn als ein ovalrundliches Körperchen mit deutlicher Eigenbewegung, als eine Monade. Er nennt ihn Monas prodigiosa.

Nach verschiedenen mehr oder weniger ungenauen Angaben über die Morphologie dieses pigmentbildenden Keimes (Fresenius 1863, Erdmann 1866, Schroeter 1872, Cohn 1872, Schottelius 1887), gab Scheurlen 1896, eine erste sorgfältige Beschreibung. 2-tägige Kulturen in normaler Nährlösung zeigten Stäbchen von einer Länge, die das 1,5 bis 2-fache der Breite betrug. An den Längsseiten waren 2-4 Geißeln vorhanden und die Enden waren abgerundet. In einer 2-tägigen Kartoffelkultur waren die Organismen zwar noch länglich ellipsoid, doch kleiner und mit einer Kapsel versehen. Dieser Zustand konnte auch an Keimen beobachtet werden, die in alkalischer Nährflüssigkeit gewachsen waren. Die Gestalt der Prodigiosusbacillen in Kartoffelkulturen führte Scheurlen auf die Einwirkung des von ihnen selbst gebildeten Ammoniaks zurück.

M i g u l a 1900, beschrieb die Keime als $0,5\mu$ breite und $0,5 - 1,0\mu$ lange Stäbchen, die manchmal in Ketten von 2-6 Bacillen vorkommen. In Bouillon mit Säurezusatz war die Beweglichkeit größer und die Kulturen zeigten die Stäbchenform deutlicher. In Zahl und Länge variable Geißeln sah er zerstreut über den ganzen Körper.

Der beobachtete Pleomorphismus konnte auch durch die Untersuchungen späterer Forscher (Wasserzug 1888, Kübler 1889, Nakanishi 1901, Lehmann und Neumann 1904, Gazzetti 1911, Frank 1934 u.a.) bestätigt werden, wobei es sich zeigte, daß Stäbchenformen bevorzugt in sauren, Kokkonformen in alkalischen Nährmedien auftreten. Serratia marcescens ist gramnegativ.

II. ALLGEMEINES ÜBER DIE PIGMENTBILDUNG BEI BAKTERIEN

Beyerinck, 1891, versuchte, die Farbstoffbakterien in 3 Gruppen einzuteilen: chromophore, chromopare und parachromophore Bakterien.

In den chromophoren Keimen soll der Farbstoff lebenswichtige Funktionen haben und funktionell mit dem Chlorophyll vergleichbar sein. Der Farbstoff wird im Plasma gespeichert. In diese Gruppe gehören die Schwefelbakterien.

Die chromoparen Bakterien sollen den Farbstoff als nutzloses Stoffwechselprodukt sezernieren. Die Bakterien selbst sollen, solange sie leben, farblos sein. Die chromoparen Bakterien bilden die Gruppe der echten Pigmentbildner. Das Chromogen findet man bei mikroskopischer Betrachtung von pigmentierten Kolonien zwischen bzw. neben den Bakterien gelagert (Obergier 1957). In diese Klasse ist die *Serratia marcescens* einzureihen.

Die parachromophoren Bakterien sollen dadurch ausgezeichnet sein, daß der Farbstoff zwar ein Exkretionsprodukt ist, aber dem Bakterienkörper fest anhaftet. Dieses Merkmal hat der *Bacillus violaceus*.

Nach Migula, 1900, wird es nicht immer möglich sein, Klarheit darüber zu bekommen, ob ein Pigment dem Bakterienleib anhaftet oder ob es sich in feinsten Verteilung in unmittelbarer Umgebung der Zelle befindet. Beyerinck 1901, meint dagegen, die Entscheidung darüber, ob eine Bakterienart chromophor oder parachromophor ist, läßt sich gewöhnlich dadurch erbringen, daß die echten chromophoren Keime sich bei Weiterzüchtung unter verschiedenen Bedingungen immer wieder zu gefärbten Kulturen entwickeln, während die unechten dies nur ausnahmsweise tun.

Nach Gazzetti 1911, ist der Entstehungsmechanismus der Farbstoffe nicht bei allen Pigmentbildnern gleich und es sind auch die Funktionen der gebildeten Pigmente verschieden.

III. DIE PIGMENTBILDUNG BEI MICROCOCCUS AUREUS

a) Allgemeines

Die biologischen Eigenschaften der Staphylokokken erstrecken sich vor allem auf die Bildung von Pigmenten, Fermenten und Giftstoffen. Auf Grund ihrer biologischen Eigenschaften werden im allgemeinen die Staphylokokken in pathogene und saprophytische Stämme, oder wie N e i s s e r 1928, vorschlägt, in Pyokokken und Saprokokken eingeteilt. Unter Pyokokken versteht er pathogene Aureusstämme.

Der Pyococcus gehört zu den chromoparen Bakterien, also zu denjenigen Farbstoffbildnern, die das Pigment als nutzloses Exkret ausscheiden. Es sammelt sich, dendritisch-krystallisch angeordnet, zwischen den Bakterienzellen an und diffundiert, weil in Wasser unlöslich, nicht in den Nährboden (Neisser 1928).

Daß Lipochrombildner auch innerhalb der Spaltpilz-Gruppe vorkommen, beobachtete schon Z o p f 1891. Er stellte fest, daß diese Organismen ein Lipochrom zur Ausscheidung bringen, das im Innern der Zelle entsteht und an das Fett des Zellinhalts gebunden ist (daher "Fettfarbstoff"). Im Micrococcus aureus hat Z o p f seinen 5. Lipochrombildner kennengelernt. Er stellte sich die Frage, ob die Zellen den Fettfarbstoff schon bei Lebzeiten zur Ausscheidung bringen, oder ob diesem Prozeß ein Absterben der Zellen vorausgehen muß. Er kam zu der Überzeugung, daß sich dieser Vorgang schon bei Lebzeiten der Zellen abwickelt. Von Z o p f stammt auch der Vorschlag, die gelben Lipochrome als Lipoxanthine zu bezeichnen.

Der Farbstoff des Micrococcus aureus besteht nach Ch a r g a f f 1934, und S t e u e r 1956, aus Zeaxanthin. Seine chemische Natur wird noch besprochen.

Es sind nun eine Anzahl von Erfahrungen publiziert worden, wonach farbstoffbildende Bakterien ihre Farbstoffproduktion im Laufe der Beobachtung veränderten. Dieser Farbstoffwechsel kann entweder durch äußere Einflüsse oder spontan, aus inneren uns unbekannten Gründen erfolgen. Hier ist also die Tendenz zur Variation vorhanden (N e u m a n n 1897).

G a z z e t t i 1911, und W i l s o n und M i l e s 1955, machen äußere Einflüsse für den Verlust der Farbe beim Staphylococcus aureus verantwortlich. G a z z e t t i 1911, sah beim Staphylococcus pyogenes aureus nach Rückimpfung

auf gewöhnlichen Nähragar weiße Kulturen auftreten, nachdem der Keim zuvor sein Pigmentbildungsvermögen auf Glyzerinnähragar erworben hatte.

Neumann 1897, und Luckhardt 1901, glauben an innere Ursachen. Luckhardt sah schöne, goldgelbe Rassen plötzlich in weiße übergehen. Lehman und Neumann (zit. nach Neumann 1897), sahen beim *Micrococcus pyogenes aureus* neben weißen auch orangefarbene Kolonien auftreten. Neumann 1897, gelang es, aus dem *Micrococcus pyogenes aureus* eine citronengelbe, eine weiße und eine fleischfarbene Modifikation zu züchten, und ferner die fleischfarbene Rasse wieder in die orange zu überführen.

b) Der Einfluß von Sauerstoff und Temperatur auf die Farbstoffbildung

Staphylococcus aureus ist gewöhnlich auf Zufuhr von Sauerstoff angewiesen. Alle seine Lebensäußerungen gehen am kräftigsten vonstatten, wenn reichlich Sauerstoff vorhanden ist. Davon macht die Pigmentbildung keine Ausnahme. Nach Liborius 1886, wird sie durch Sauerstoffmangel sogar am leichtesten gehemmt. Auch andere Autoren (Lubinski 1894, Neisser 1928, Wilson und Miles 1955) weisen darauf hin, daß Sauerstoff für die Pigmentbildung des *Staphylococcus aureus* von ausschlaggebender Bedeutung ist, da unter anaeroben Verhältnissen das Wachstum farblos ist.

Nach Neumann 1897, scheint Kohlensäure und Wasserstoffatmosphäre nicht dauernden Pigmentverlust herbeizuführen. CO_2 soll sogar die Pigmentbildungsfähigkeit steigern, vorausgesetzt, daß Sauerstoff vorhanden ist (Lubinski 1894). Aus dieser schon länger bekannten Erscheinung, folgert Liborius, 1886, daß die Bakterien nicht den Farbstoff selbst, sondern nur eine chromogene Substanz liefern, die erst durch Oxydation in den Farbstoff umgewandelt wird.

Offensichtlich anders liegen die Verhältnisse bei Streptokokken, denn Obiger 1957, stellte bei Untersuchungen an 6 *Agalactiae*-Stämmen fest, daß dem Sauerstoff keine entscheidende Rolle bei der Pigmentbildung zukommt. Im Gegenteil, die Ergebnisse sprechen für seine Entbehrlichkeit. Denn bei Verringerung des Sauerstoffs und Vermehrung des CO_2 -Gehalts wurden die Farbstoffe intensiver und schöner. Eine Steigerung ihrer Farbstoff-bildenden Kraft erfuhren die Streptokokken in Anaerobiose. Im sauerstofffreien Milieu entfalteten alle 6 Stämme ihr Pigmentbildungsvermögen voll.

Die günstigste Temperatur für die Pigmentbildung des *Micrococcus aureus* soll nach den meisten Forschern (Neisser 1928, Reid 1936, Müller 1950, Wilson und Miles 1955) 20 - 22°C sein.

Schottelius 1887, stellte fest, daß eine Herabsetzung der Temperatur, solange Wachstum überhaupt noch möglich ist, keinen Einfluß auf die Farbbildung habe. Ganz anders sei es dagegen mit erhöhten Temperaturen.

Auch Migula 1900, der beobachtete, daß das beste Wachstum des *Micrococcus aureus* zwischen 30 und 37°C stattfindet, sah bei höheren Temperaturen ein Ausbleiben der Pigmentbildung.

Steuer 1956, gibt jedoch entgegen den Literaturangaben als beste Temperatur für Pigmentbildung und Wachstum 37°C mit Licht an. Er stellte eine zeitliche Differenz zwischen Wachstum und Pigmentbildung fest, und zwar hinkte die Pigmentbildung um einige Stunden nach.

c) Der Einfluß von Licht auf die Farbstoffbildung

Der Einfluß des Lichtes auf Pigmentbildner wurde von mehreren Forschern untersucht.

Liborius 1886, (zit. nach Neumann 1897), nahm das Ausbleiben der Pigmentbildung bei vor Licht geschützten Kulturen wahr. Dagegen stellte Luckhardt 1901, fest, daß Lichtabschluß die Pigmentbildung des *Staphylococcus aureus* nicht hemmt, während *Staphylococcus citreus* weiß wird. Auch Zopf 1889, gibt bekannt, daß die Lipochrombildung nicht an die Gegenwart von Licht gebunden ist.

Das Sonnenlicht ist der Produktion der Farbstoffe jedoch wenig günstig (Gaillard 1888, Raum 1889). Auch Beck und Schultz 1896, fanden, daß Sonnenlicht eine hemmende Wirkung auf die Pigmentbildung besitzt. Sie kamen zu der Feststellung, daß das diffuse Tageslicht die günstigste Bedingung darstellt.

Füchtbauer 1950, und Obiger 1957, messen dem Licht bei der Farbstoffentstehung keine Bedeutung bei. Alle Stämme bildeten ihre Farbstoffe im Hellèn wie im Dunkeln in gleichem Maße.

F ü c h t b a u e r 1950, stellte noch fest, daß Bakterien, die gelben Farbstoff produzieren, besonders resistent gegen kurzwelliges Licht sind.

d) Der Einfluß der Nährbodenzusammensetzung auf die Farbstoffproduktion

Die Pigmentbildung bei Bakterien hängt nicht nur vom freien Zutritt des Sauerstoffs und von der Temperatur ab, sondern als ein wesentlicher Faktor für die Farbstoffbildung kann auch die Zusammensetzung des Nährbodens betrachtet werden.

So schreibt N o g u c h i 1911, den Bestandteilen des Nährbodens den Haupteinfluß zu. Er empfiehlt auf Grund seiner Ergebnisse eine hohe Zuckeragarschicht (0,4 % Traubenzuckeragar) als idealen Nährboden. N e i s s e r 1928, benutzte für seine Versuche ebenfalls den von N o g u c h i 1911, empfohlenen Nährboden.

Ältere Forscher, wie M i g u l a 1900, stellen gute Farbstoffbildung auf Kartoffeln oder Reismehlnährböden fest.

Der Anwesenheit verschiedener Salze wird von S u l l i v a n 1905, große Bedeutung beigemessen. Besonders gute Erfolge hat er mit Phosphaten erzielt. M a r y H e f f e r a n 1904, dagegen arbeitete mit einigen Stämmen, die sogar ohne eine Spur von Magnesiumsulfat Farbstoffbildung erkennen ließen.

Das Glyzerin kann nach G a z z e t t i 1911, einen verschiedenen Einfluß auf Mikroorganismen ausüben. Wird Glyzerin dem Agar zugesetzt, dann hemmt es die Farbstoffbildung des Staphylococcus pyogenes aureus, wird es der Bouillon oder Gelatine zugegeben, dann wirkt es fördernd. Glyzerin kann also die Farbstoffezeugung bald hemmen und bald fördern, ganz unabhängig von dem Einfluß, den es auf die Entwicklung der Keime ausübt.

R e e d und R i c e 1929, untersuchten den Einfluß von Eisen auf die Pigmentation säurefester Bakterien. Nach ihren Ergebnissen ist die gelbe, braune oder rote Farbstoffproduktion von säurefesten Bakterien nur bei Anwesenheit von Eisen im Nährboden möglich. Staphylococcen sind dagegen nicht auf Fe im Nährboden angewiesen.

Nach B o l l e 1955, scheint bei Überimpfung auf Pepton- und Glukose-Nähr-

böden das Pigment zurückzugehen. Nach erneuter Überimpfung auf Gelose ($C_6H_{10}O_5$) jedoch stellte er wieder intensivere Gelbfärbung fest.

St e u e r 1956, erkannte das Glycerin als pigmentbildungshemmenden Stoff. Nachdem er aber Glycerin durch Glycerinmonophosphat ersetzt hatte, erreichte er starke Förderung der Farbstoffbildung. Es handelt sich anscheinend um eine spezifische Wirkung von Glycerinmonophosphat (Merck), da im Nährboden nach L o r d 1952, anorganische Phosphate in Form von sekundärem Ammoniumphosphat und sekundärem Kaliumphosphat vorhanden sind (St e u e r 1956).

e) Chemie des Zeaxanthins (Pigment von *Micrococcus aureus*)

Nach S c h n e i d e r 1894, löst sich der Farbstoff in Alkohol mit schön goldgelber Farbe, ferner in Aether, Schwefelkohlenstoff, Benzol und Chloroform.

Zeaxanthin, $C_{40}H_{56}O_2$, bildet rein gelbe, von Methanol freie und linksdrehende Kristalle vom Schmelzpunkt 207° . Seine Darstellung aus Mais (*Zea mays*) gelang zuerst K a r r e r und Mitarbeitern (zit. nach B e r g m a n n 1933). Das Zeaxanthin gehört zu den Xanthophyllen.

Xanthophyll ist heute ein Sammelbegriff, unter dem alle hydroxyhaltigen Carotine wie Zeaxanthin, Lutein u. a. zusammengefaßt werden. Das Carotin ist von K a r r e r u. a. in zwei, von K u h n u. a. (zit. nach F i n k und Z e n g e r 1934), in drei isomere Komponenten α , β und γ zerlegt worden. Das Zeaxanthin soll sich nach B e r g m a n n 1933, sowie K u h n und B r o c k m a n n 1932, vom β -Carotin ableiten, und zwar aus der Polenkette.

Die Carotinoide sind eine Gruppe gelber bis roter Farbstoffe, die vor allem durch 2 Eigenschaften charakterisiert werden. Einmal durch ihre Fettlöslichkeit, daher auch Lipochrome genannt (G a z z e t t i 1911, B e r g m a n n 1933), und zum anderen durch die indigoblaue Farbreaktion, die Lipocyaninreaktion, mit konz. Schwefelsäure (Z o p f 1889, B e r g m a n n 1933, S t e u e r 1956).

Zeaxanthin enthält wie Carotin 11 Doppelbindungen (siehe Strukturformel!).

Die Ausbeute pro g Trockensubstanz war nach S t e u e r 1956 ungefähr 0,2 mg Zeaxanthin.

IV. DIE PIGMENTBILDUNG BEI SERRATIA MARCESCENS

a) Sitz der Pigmente

Serratia marcescens, häufig auch als *Bacterium prodigiosum* bezeichnet, gehört nach *Beyerinck* 1891, als bekanntestes Beispiel der echten Pigmentbakterien in die Gruppe der chromoparen Bakterien. Es zeichnet sich durch die Bildung eines intensiv roten Pigmentes aus, das von *Kraft* 1902, als "Prodigiosin" bezeichnet wurde, obwohl es ihm nicht geglückt war, es auch nur annähernd rein darzustellen.

Früher war man der Ansicht, das rote Pigment werde von den Keimen in die Umgebung ausgeschieden (*Schroeter* 1872, *Cohn* 1872, *Wernich* 1879), heute weiß man, daß der Farbstoff vornehmlich an den Bakterienleib bzw. die Hülle gebunden bleibt.

So berichtet schon *Beyerinck* 1891, daß der Farbstoff nicht aus den Kolo-nien hindusdiffundiert, sondern sich sofort an eiweißartigen Teilchen bindet, welche vielleicht von den Bakterien selbst erzeugt werden. Auffallenderweise binden die toten *Prodigiosus*bakterien das rote Pigment nicht.

Nakanishi 1901, stellte teils freie, teils der Zellmembran des Keimes anhaftende Pigmentkörnchen fest. Dagegen konnte er niemals im Innern der Bakterienzelle rote Körnchen nachweisen. Es zeigte sich, daß die Zellen, an deren Wandung Pigmentkörner haften, in der Regel wie degeneriert aus-sahen. In diesem Falle hatten sie keine scharfen Konturen und kein differenziert färbbares Cytoplasma, Außerdem agglutinieren sie meist, falls sie in großer Zahl an einer Stelle gefunden werden.

Auch *Solm* 1923, gibt an, daß der Farbstoff aus kleineren und größeren Pigmentkörnchen bestehe, welche nicht innerhalb, sondern außerhalb der Bak-terienzelle liegen.

Wrede und Hettche 1929, die Untersuchungen "über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus prodigiosus*", anstellten, fanden es zweckmäßig die Bakterien vor der Extraktion durch verdünnte Lauge zu zerstören, da das Prodigiosin von den Bakterien-Leibern eingeschlossen wird.

Moycho 1930, sah das Pigment am Ende von 2 bis 5 Tagen erscheinen. Er schloß daraus, daß das Prodigiosin kein Produkt des Stoffwechsels der lebenden

Zelle sei, sondern vielmehr beim Tode des Bakteriums entstehe.

F ü c h t b a u e r 1950, hat durch mikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen festgestellt, daß bei *Bacterium prodigiosum* der ausgeschiedene Farbstoff seitlich an einem Pol liegt. Das Körnchen ist nur sehr klein und nimmt $\frac{1}{8}$ des Längendurchmessers des gesamten Organismus ein.

Nach Versuchen von K r a f t 1902, und A b r a m o w i c z 1953, ist der Farbstoff an die Bakterien bzw. an die Hülle gebunden. Diese Autoren setzten den vom Zelleib isolierten Farbstoff dem Licht aus und sahen, daß er in einer gewissen Zeit entfärbt wurde. Dagegen trat keine Entfärbung ein, wenn er von dem Bakterium nicht getrennt war. Danach bestand eine innige Verbindung von Farbstoff und Bakterienzelle.

A b r a m o w i c z 1953, beschreibt das Pigment als granuläre Schollen oder kleine Tröpfchen in der Bakterienmembran, zum Teil aber auch in der nächsten Umgebung der Kolonien.

b) Der Einfluß von Sauerstoff und Temperatur auf die Farbstoffbildung

Als Grundbedingung für die Pigmentproduktion ist der ungehinderte Zutritt von Sauerstoff erkannt worden. C o h n 1872, S c h o t t e l i u s 1887, und W a s s e r z u g 1888, haben dies als erste nachgewiesen. Eine Reihe anderer Autoren (T h u m m 1895, S c h e u r l e n 1896, N o e s s k e 1900, L u c k h a r d t 1901, L e h m a n n und N e u m a n n 1904, S o l m 1923, A m a k o 1930, M ø y c h o 1930, H e t t c h e 1932, R e i d 1936) bestätigen das Ausbleiben der Pigmentbildung bei Sauerstoffabschluß.

Bei Kohlensäurezusatz wächst *Serratia marcescens* nach den Angaben von S c h o t t e l i u s 1887, ebenfalls farblos. In reiner Kohlensäureatmosphäre vermag sich nach S c h e u r l e n 1896, dagegen diese Keimart überhaupt nicht zu entwickeln.

Eine weitere Bedingung für die Farbstoffbildung sind angemessene Temperaturverhältnisse. Die Pigmentproduktion geht am besten bei niedriger Temperatur vor sich, wie schon M i g u l a 1900, festgestellt hat. Doch wird von den Forschern ein verschiedenes Temperaturoptimum angegeben.

Reid 1936, findet beste Pigmentation bei 20 - 22°C. Frank 1934, hat seine Kulturen im Wärmeschrank bei 22°C gehalten. Andere Autoren, wie Amako 1930, sowie Eisler und Jacobsohn 1935, fanden bei 22°C beste Farbstoffbildung. Kraft 1902, Lehmann und Neumann 1904, Solm 1923, und Hettche 1932, erreichten ein Optimum für Pigmentbildung bei 22 - 23°C. Wrede und Hettche 1929, beobachteten optimale Farbstoffbildung bei 25°C. Sogar noch höhere Temperaturen, zwischen 27 und 30°C, werden für beste Farbbildung der *Serratia marcescens* angegeben (Wernich 1879, Müller 1950, Obiger 1957).

Alle Forscher sind sich aber einig, daß Brutschrank-Temperaturen von 37°C und darüber die Pigmentproduktion stören, hemmen oder farblose Kulturen entstehen lassen (Schottelius 1887, Beck und Schultz 1896, Scheurlen 1896, Luckhardt 1901, Milburn 1904, Lehmann und Neumann 1904, Amako 1930, Müller 1950, Abramowicz 1953). Nur Kazakow und Kotschergina 1935, (zit. nach Reid 1936), berichten, o.1 ccm einer gesättigten Kochsalzlösung auf 5 ccm Fleischbrühe verursache Pigmentproduktion beim *Bacterium prodigiosum* bei 37°C.

Werden farblose Kulturen, die bei Bruttemperatur gewachsen sind, in die Zimmerwärme zurückversetzt, so tritt die Pigmentbildung allmählich wieder ein. Daraus geht hervor, daß die charakteristische Funktion der Farbstoffbildung bei *Serratia marcescens* künstlich unterbunden werden kann, ohne daß dabei der Keim selbst an seiner Lebens- und Fortpflanzungsfähigkeit Schaden leidet (Solm 1923).

Wernich 1879, stellte bei einer Zimmertemperatur von 18°C die frühesten Zeichen des Wachstums auf gekochten Kartoffeln nach 15 Stunden, den Beginn der Pigmentbildung nach 24 - 30 Stunden fest.

c) Der Einfluß von Licht auf die Farbstoffbildung

Wie auf alle übrigen Pigmentbildner, wirkt das Sonnenlicht auch auf das "*Bacterium prodigiosum*" hemmend (Laurent 1890, Buchner 1892, Geisler 1892, Schneider 1894, Milburn 1904, Hettche 1932).

Schroeter 1872, bemerkt, daß das Licht zur Bildung des Pigmentes nicht nötig sei, und daß aber ebensowenig der Ausschluß desselben die Entwicklung

zu fördern scheine. Diesen von S c h r o e t e r beobachteten Einfluß des Lichtes bestätigte auch W e r n i c h 1879.

Nach D i e d o n n e 1894, kann direktes Sonnenlicht auch die Farbstoffbildung gänzlich verhindern. B e c k und S c h u l t z 1896, konnten diese Befunde nicht bestätigen. Auch K r a f t 1902, sah keinen konstanten Einfluß des diffusen Tageslichtes auf die Farbstoffbildung und das Wachstum.

K o t l j a r 1892, stellt auf Grund seiner Versuche fest, daß das Sonnenlicht zwar das Wachstum des "Prodigosus" hemmte, sich aber direkt auf die Pigmentbildung nicht auswirkte. Die Differenzen in der Farbstoffproduktion entsprachen völlig der unterschiedlichen Üppigkeit des Wachstums der Kolonien.

A m a k o 1930, berichtet, daß die Farbstoffbildung im Dunkeln sehr verspätet eintritt, im diffusen Lichte dagegen schnell und lebhaft vor sich geht.

K r e i t l o w 1942, findet bei Kultivierung im Dunkeln stärker pigmentierte Organismen als im diffusen Tageslichte.

Auch Röntgenstrahlen scheinen nach den Versuchen von B e c k und S c h u l t z 1896, die Pigmentbildung nicht zu beeinflussen. K r a u s e 1900, konnte mittels eines Funkeninduktors eine geringe Änderung in der Farbstoffbildung hervorrufen. Sie wurde auf eine starke Erwärmung, eine Ozonbildung oder eine elektrolytische Zersetzung des Nährbodens zurückgeführt.

d) Der Einfluß der Nährbodenzusammensetzung und des pH- Wertes auf die Farbstoffproduktion

Äußere Ursachen, die einen Einfluß auf die Farbstoffproduktion ausüben, sind, wie bereits berichtet, Sauerstoff, Temperatur, Licht. Doch eine sehr große Rolle spielt auch die passende chemische Beschaffenheit des Nährsubstrates.

Wie bereits angegeben, vegetiert *Serratia marcescens* gern auf kohlenhydratreichen Nahrungsmitteln, denn sie enthalten alle für das Wachstum und die Pigmenterzeugung notwendigen Elemente in homogener Verteilung.

Von den anorganischen Bestandteilen der gebräuchlichen künstlichen Substrate spielen Magnesium- und Schwefelverbindungen eine Rolle. So halten z.B. T h u m m 1895, sowie N o e s s k e 1900, Magnesium für die Farbstoffbildung

als unentbehrlich. Durch größere Mengen Magnesiumsulfat wird die Farbstoffbildung ungünstig beeinflusst (Thumm 1895, Noesske 1900). Eine Menge von 1/2 % Magnesiumsulfat sei schon zu viel. Noesske hat weiter die Tatsache ermittelt, daß die Pigmentbildung nicht proportional der Intensität der Keimentwicklung erfolgt, sondern um so mehr abnimmt, je üppiger der Keim wächst. "Nicht trotz, sondern infolge zu günstiger Vegetationsbedingungen sistiert manchmal die Farbstoffproduktion". Auch Schwefel ist nach Noesske 1900, für die Farbstoffproduktion notwendig. Und er erklärt, kein anderes chemisches Element vermag das Magnesium und den Schwefel im Nährsubstrat in dieser Funktion zu ersetzen.

Kuntze (1900, 1907), hat bei der Züchtung des "Bacterium prodigiosum" besonders die chemische Zusammensetzung der Nährböden berücksichtigt. Bei seinen sehr sorgfältig ausgeführten Versuchen hat sich ergeben, daß nicht immer diejenigen Stoffe, die ein Wachstum des Keimes bewirken, gleichzeitig auch die Farbstoffbildung hervorrufen. Unter Verwendung chemisch reiner Eiweißkörper, Zuckerarten, organischer und anorganischer Salze mit Ausschluß von Magnesium und Schwefelverbindungen und unter allen möglichen Kautelen stellte Kuntze in wiederholten Versuchen ein deutliches, wenn auch beschränktes Wachstum des "Prodigiosum" fest, die Farbstoffbildung jedoch blieb völlig aus. Setzte man nun nachträglich den farblosen Kulturen einige Kristalle reinen Magnesiumsulfats zu, so zeigte sich innerhalb 48 Stunden bis zu 4 Tagen deutliche Farbstoffbildung. Zugleich zeigte sich auch besseres Wachstum. Demzufolge war es klar geworden, daß die Gegenwart von Magnesium und Schwefel letzterer in Form von Sulfaten - für die Farbstoffproduktion des Keimes unentbehrlich ist. Kuntze hat weiter festgestellt, daß ein Zusatz von 0,001 % $MgSO_4$ genügt, um deutliche Pigmentbildung anzuregen.

Im Laufe seiner Versuche hat Kuntze mehrmals erfahren müssen, daß selbst ganz geringe Anteile von fremden Beimengungen, die chemisch kaum noch nachweisbar sind, bisweilen von ganz wesentlichem Einfluß auf die chromogene Funktion der *Serratia marcescens* sein können.

Samkow 1903, anerkennt, daß für die Farbstoffbildung das Magnesium unentbehrlich sei, nicht aber Sulfat, wenigstens nicht unter allen Umständen.

Nach Milburn 1904, scheint ein Substrat, das Nitrat oder Phosphat in reichlicher Menge enthält, die Produktion des gelben Farbstoffes zu fördern.

Nach Amako 1930, ist Magnesiumsulfat für die Bildung des roten Farbstoffes und Kaliumbiphosphat für die Bildung des gelben Farbstoffes notwendig. Danach

läßt sich vermuten, daß der gelbe Farbstoff ein Oxydationsprodukt des roten ist und bei Abwesenheit von phosphorsauren Salzen das Oxydationsvermögen gestört wird.

S u l l i v a n 1905, stellte fest, daß das Magnesiumsulfat für die Bildung des roten Farbstoffes größere Bedeutung habe, als phosphorsaure Salze. Sulfate können aber auch durch Chloride oder Nitrate ersetzt werden.

H e f f e r a n 1904, stellt die Behauptung auf, Magnesiumsulfat sei nicht bei allen "Prodigosus-Stämmen" zur Farbstoffbildung nötig, ebenso könne Phosphor bei manchen für das Wachstum entbehrt werden.

Über den Einfluß organischer Verbindungen auf die Pigmentbildung liegen Berichte folgender Autoren vor:

Nach der Meinung von R e i d 1936, begünstigen organische Metallverbindungen die Pigmentation nicht. Kohlenhydrate dagegen verbessern die Farbstoffproduktion, wenn sie zu Nährboden gegeben werden, die eine gute Sauerstoffquelle und die wesentlichen anorganischen Bestandteile besitzen.

M a r y B u n t i n g 1949, beobachtete nach Zugabe von Kohlenhydrat zum Medium vermehrtes Wachstum und ein Hinausschieben der Sterbephase. Da danach aber das Sterben um so schneller vor sich ging, vermutete sie eine Abgabe giftiger Stoffe ins Medium.

Wachstum und gute Pigmentbildung stellt M o y c h o 1930, fest auf einem Nährboden, der 1:100 Peptonwasser und 0,5:100 NaCl enthielt.

W r e d e 1930, erzielte die besten Ergebnisse bei Verwendung von dünnen Agarplatten, die Pepton, Maggis Fleischbrühe, Glykose und etwas Magnesiumsulfat enthielten.

S c h n e i d e r 1894, und K r a f t 1902, sahen beste Pigmentbildung auf Reisböden, und O b i g e r 1957, auf stärkereichen Substraten oder Serum. Auch G r i f f i t h s 1892, bevorzugte stärkehaltigen Nährboden.

Nach A m a k o 1930, und A b r a m o w i c z 1953, soll das NH_4 -Radikal in organischer Verbindung besonders wirksam sein. Das Radikal wird in NH_2 oder NH_3 umgewandelt und diese beiden Gruppen beeinflussen die Pigmentierung vorteilhaft. Es gibt noch eine Reihe von Aminosäuren und anderen N-haltigen Verbindungen, die die Farbstoffbildung günstig beeinflussen.

F r a n k 1934, ist auf Grund seiner Versuche der Ansicht, daß die Farbstoffbildung im allgemeinen auf solchen Nährböden intensiver ist, die Eiweiß und Gelatine enthalten, dagegen weniger kräftig auf solchen, die Stärke oder ähnliche Substanzen und Agar enthalten. Eiweißfreier Nährboden hemmt die Farbstoffbildung des "Prodigiosus" nach S o l m 1923, während L e h m a n n und N e u m a n n 1904, auch auf diesen Nährböden farbige Kolonien sahen.

K r a f t 1902, und L e h m a n n 1904, haben auf Tyrosinzusatz gute Erfolge gesehen. Bei Zusatz von 0,05 g Tyrosin auf 10 g Nährflüssigkeit vergrößerte sich die Farbstoffmenge um das 6-fache.

N o v e l l i 1954, beobachtete günstige Pigmentation nach Hinzufügen von Pyrrolverbindungen zum Kulturmedium.

G a z z e t t i 1911, setzte verschiedenen Nährsubstraten Glycerin in einer Dosis von 5 % zu und beobachtete einen ungünstigen Einfluß auf die Pigmentbildung. A b r a m o w i c z 1953, dagegen, sah eine Förderung der Farbstoffbildung auf Loeffler-Serum, bei einem Glycerinzusatz von 1 - 5 %, während auf Agar und Bouillon bis zu 2 % Glycerin ebenfalls Förderung, bei höheren Zusätzen eine Hemmung der Pigmentproduktion eintrat.

G r i f f i t h s 1892, R o s e n b e r g 1899, S o l m 1923, u.a. fanden das Pigment auf gekochten Kartoffeln am intensivsten.

M a r x 1900, konnte für "Bacterium prodigiosum" und andere Keime nachweisen, daß sie auf der stark sauren, gelben Mohrrübe ohne Farbstoffbildung wachsen. Die schwachsaure Kartoffel sieht er jedoch als einen für die Farbstoffproduktion durchaus günstigen Nährboden an.

Nach A m a k o 1930, tritt auch durch Serumzugabe zum Substrat eine Beeinflussung der Pigmentproduktion ein. Aktives Immuns Serum begünstigt, während Normalserum ungünstig wirkt. Besonders aber wird die Farbstoffbildung durch solches Immuns Serum gefördert, zu dessen Bereitung die lebenden Bakterien als Antigen dienen.

Eine weitere, nicht unwesentliche Bedingung für die Pigmentation ist die Reaktion des Nährbodens. Auch hier variieren die Angaben der Autoren.

R e i d 1936, gibt als Reaktionsoptimum pH 6.6 - 8.0 an, G o r b a c h 1929, (zit. nach H e t t c h e 1932), pH 6.4 und A b r a m o w i c z 1953,

pH 7.0 - 7.5. Bei starker Alkaleszenz oder hohem Säuregrad bildet der "Prodigiosus" keinen Farbstoff (S o l m 1923, L u c k h a r d t 1901). Am kräftigsten entwickelt er sein rotes Pigment auf neutralem oder schwachsaurem Substrat (S o l m 1923, K u n t z e 1900).

Nach M i l b u r n 1904, bildet "Bacterium prodigiosum" nur auf saurem Nährboden seine rote Farbe, auf neutralem wächst er farblos. Dieselbe Beobachtung hatte auch W a s s e r z u g schon 1888 gemacht. Nach K u n t z e 1900, kann man bei farblosen Kolonien noch nachträglich Farbstoffbildung erreichen, wenn die Reaktion der stark alkalisch gewordenen flüssigen Kulturen durch Säurezusatz korrigiert wird, selbst wenn die Kulturen schon über 4 Wochen farblos gestanden haben.

H e f f e r a n 1904, fand im sauren Medium eine Tendenz des Farbstoffes nach rot-violett, in alkalischem Milieu nach rot-orange.

M o y c h o 1930, beobachtete rotes Pigment bei pH 4.0 - 8.0 und gelbliches Pigment bei pH 8.0 - 9.0.

Schließlich ist die Pigmentbildung auch von der Konsistenz des Nährsubstrates abhängig. Nicht allein das Wachstum, sondern auch die Produktion von Farbstoff soll sich nach S o l m 1923, sowie A b r a m o w i c z 1953, bei *Serratia marcescens* auf festen Nährböden besser und üppiger vollziehen als in flüssigen Medien.

e) Sonstige Beeinflussung der Farbstoffbildung

In ihrem physiologischen Verhalten, hauptsächlich in ihrer chromogenen Funktion, ist *Serratia marcescens* von den umgebenden Lebensverhältnissen wie Sauerstoff, Temperatur, Licht und chemischer Zusammensetzung des Nährbodens abhängig. Wird eine dieser genannten Bedingungen verändert, so tritt auch eine Veränderung in der physiologischen Tätigkeit des Keimes ein. Er kann dann z. B. die Fähigkeit, roten Farbstoff zu bilden, verlieren. Wenn aber wieder normale Verhältnisse eintreten, dann stellt sich das Pigmentbildungsvermögen allmählich wieder ein. Hier kann man von einer Anpassung an veränderte Umweltsverhältnisse sprechen.

Nun wächst das "Bacterium prodigiosum" nicht nur gleichmäßig dunkelrot und farblos, sondern die Farbe der Kulturen vom gleichen Stamm, auf dem gleichen

Nährboden, kann auch ohne erkennbare Ursache sehr variieren. Außer farblose Kolonien wurden rosaweißliche, blaßrosa, kräftig rosafarbene, orangerote, ziegelrote, carminrote und blaurote beobachtet (Neumann 1897, Kraft 1902, Hefferan 1904, Lehmann und Neumann, 1904, Eisenberg 1914).

Farbloses Wachstum z.B. erhielten Schottelius 1887, und Scheurlen 1896, bei fortgesetzter Züchtung, indem sie immer die blassesten Kolonien überimpften.

Laurent 1890, brachte bestrahlte Keime auf Kartoffelscheiben und erhielt alle Farben von weiß bis rot. Die farblosen und schwach rosa Kolonien ergaben nach der 2. und 3. Passage ohne Ausnahme leuchtend rote Kolonien.

Luckhardt 1901, vermutet in farblos wachsenden Kulturen von Pigmentbakterien Leukoprodukte der Farbstoffe, wahrscheinlich niedere Oxydationsstufen derselben.

Gazzetti 1911, erhielt farblose Stämme, indem er Kulturen, die mehrere Generationen hindurch auf Glycerinagar gewachsen waren, wieder auf glyzerinfreie Nährböden verpflanzte. Nach den ersten Passagen behielt der Keim chromogenes Vermögen bei, dann aber hatte er es endgültig verloren.

Eisenberg 1914, ist der Meinung, daß die verschiedenen Farbvariationen innere Ursachen haben. Er beobachtete auch in flüssigen Medien eine höhere Ausbeute an Mutanten.

Mary Bunting 1949, untersuchte die zahlreichen Farbvariationen dieser Keimart, Stamm 274. Bei Ausspatelungen von 3-tägigen Agarkulturen erkannte sie den dunklen Typ als den stabilsten. Er hatte nur 2 % abweichende Nachkommenschaftskolonien. Die helleren Typen dagegen ergaben bis zu 50 % dunkle und hellere bis weiße Kolonien.

Kaplan 1949, (zit. nach Müller 1950), nimmt auf Grund von Mutationsversuchen in der kleinen Serratia-Art mindestens 1200 "Gene" an, also Molekelgruppen.

Kaplan 1953, untersuchte auch die Farbsektor- sowie die Debenal-Resistenz-Mutationen dieses Keimes (Debenal = Sulfadiazin (Sulfonamid) ,

$H_2N \cdot C_6H_4 \cdot SO_2NH \cdot C_4N_2H_4$). Keimsuspensionen wurden mit UV 254 μ

bestrahlt, und während oder bis 15 min nach der Bestrahlung unter N_2 , CO_2 - oder Luftatmosphäre gehalten. Dann wurde die Rate der Farbsektor-, der Debenalresistenz-Mutationen sowie die Keimtötung getestet. Der dabei erhaltene geringe Effekt bei UV beruht nach K a p l a n vorwiegend auf Genmutationen.

A m a k o 1930, hat den Einfluß der Tierpassage auf die Farbstoffbildung dieses Keimes untersucht, indem er Mäusen virulente Kolonien intraperitoneal injizierte. Er stellte dabei fest, daß nach der Tierpassage die Farbstoffbildungsfähigkeit gesteigert wird. Aus dieser Tatsache schließt er, daß zwischen Farbstoffbildung und Bakterienfermenten innige Beziehungen bestehen müssen. Und so wurde durch dahingehende Versuche festgestellt, daß die Katalase ein die Farbstoffbildungsfähigkeit förderndes Ferment ist. Die Farbstoffbildung verläuft parallel dem Katalasegehalt.

f) Chemie des Prodigiosins (Pigment von *Serratia marcescens*)

Das Prodigiosin wird fälschlicherweise teils zu den Lipochromen (Schroeter 1872), teils zu den Anilinfarbstoffen gerechnet (Erdmann, zit. nach Scheur-
len 1896, Gazzetti 1911). Schroeter 1872, hat jedoch bewiesen, daß die Farbstoffe des "Prodigiosus" nicht die Farbreaktion von Carotinoiden geben.

Der Farbstoff wird durch Alkalien orangegelb, durch Säuren karmin- bis violettrot (Petrov 1902, Lehmann und Neumann 1904). Scheur-
len 1896, beschreibt ebenfalls das Gelbwerden der roten Lösungen durch Alkali. Er findet den Farbstoff frei von Schwefel und Phosphor. Auch Stickstoff konnte er nicht nachweisen.

K r a f t 1902, gibt einen Stickstoffgehalt von 3,90 % an, und nach Griffiths, 1892, beträgt der N-Gehalt des Farbstoffes 3,07 %. Lehmann und Neu-
m a n n 1904, zweifeln am Stickstoffgehalt.

Typisch für das Prodigiosin ist die Löslichkeit in Lipidlösungsmitteln (z. B. Alkohol, Äther, Chloroform, Eisessig, Schwefelkohlenstoff u.a.) und die Unlöslichkeit in Wasser. Dies bestätigen eine Reihe von Autoren, nur Schroeter 1872, und Eisenberg 1914, halten das Pigment für wasserlöslich. Die Lichtechtheit des Prodigiosins ist nicht sehr groß. Der Farbstoff bleicht rasch, sowohl trocken als in Lösung. 1 qm Kulturfläche (Agar) liefert bestenfalls 200 mg des Farbstoffes.

K r a f t 1902, konnte feststellen, daß gelbe und rote Kartoffelkulturen das gleiche Prodigiosin liefern. Durch die Capillar-Analyse hat er die Einheitlichkeit des Farbstoffes bewiesen.

W r e d e und H e t t c h e 1929, waren imstande, das Prodigiosin in einer reineren Form zu erhalten als früher. Bei der Analyse des Rohprodigiosins gewannen sie nur 2 % reinen Farbstoff und 98 % fettähnliche Stoffe. Für den reinen Farbstoff setzten sie die Summenformel $C_{20}H_{25}N_3O$ fest. G r i f f i t h s 1892, gab die Formel $C_{38}H_{56}NO_5$ an. In späteren Arbeiten von W r e d e 1932, W r e d e und R o t h h a a s 1933, wurde gezeigt, daß in dem Molekül des Prodigiosins 2 Pyrrolringe methenartig verbunden sind. "Ring I" ist ein offenbar 3-fach substituiertes Pyrrol von der Formel $C_{10}H_{17}N$, "Ring II" ist ein -Methoxy-pyrrol von der Formel $C_4H_4N(OCH_3)$. Die Autoren vermuten noch einen dritten unsubstituierten Pyrrolring. Sie halten das Prodigiosin wahrscheinlich für ein Dipyrrylmethen. Weiter ist gefunden worden, daß das Prodigiosin trotz seiner 3 Stickstoffatome nur eine einsäurige Base ist.

Leider gelang es W r e d e 1930, nicht, durch spektroskopische Untersuchung eine Klärung der chemischen Konstitution oder einen Hinweis auf die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Farbstoffklasse zu bekommen.

Nach A m a k o 1930, ist das Prodigiosin nicht einheitlich, sondern besteht aus 4 verschiedenen Farbstoffkomponenten, verschiedener Löslichkeit. Er nennt einen roten, einen dunkelvioletten, einen gelben und einen schwarzbraunen Farbstoff.

W i l l i a m s 1956, fand ebenfalls 4 Farbstoffkomponenten, eine blaue, die noch nicht beschrieben wurde, dann rote oder orangerote. Spektroskopische und chemische Untersuchungen haben gezeigt, daß die Komponenten verschiedene Substanzen sind, aber scheinbar miteinander verwandt durch eine gemeinsame Grundstruktur.

C. EIGENE VERSUCHE

I. MATERIAL UND METHODIK

a) *Micrococcus aureus*

Für meine Versuche benutzte ich *Micrococcus aureus*, Stamm SG 511, aus der Sammlung des Tierhygienischen Institutes. Dieser Stamm wurde zunächst auf gewöhnlichen Schrägagar, pH 7,2, geimpft und bei 37°C gezüchtet. Eine derartig gewachsene 24-stündige Kultur wurde mit einer Oese vorsichtig abgenommen und in steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Die Aufschwemmung wurde dann längere Zeit gut durchgeschüttelt, um eine gleichmäßige Suspension zu erhalten. Danach wurde diese Bakterienaufschwemmung im Lange-Photometer, bei gelbem Filter, auf den Extinktionswert $0,8 = E_{1g}$ eingestellt. So war das Ausgangsmaterial geschaffen, von dem jeweils 0,1 ccm = Volumen V_1 auf Petrischalen mit verschiedener Zusammensetzung des Nährbodens gegeben und dann mit einem Trigalski-Spatel sorgfältig ausgespatelt wurden. Jede Petrischale enthielt 10 ccm Nährboden.

Nach Bebrütung der Platten bei verschiedenen Temperaturen erfolgte die Abschwemmung der Petrischalen mit immer gleichen Flüssigkeitsmengen (10 ccm sterile physiologische Kochsalzlösung/Platte). Die Abschwemmung wurde zunächst zentrifugiert, dann der Überstand abgegossen und die Bakterienmasse zweimal gewaschen. Das Zentrifugieren erfolgte jeweils 15 Min. bei 6 000 Upm.

Danach wurde die Bakterienmasse mit 10 ccm physiol. Kochsalzlösung aufgefüllt, 10 Min. im Schüttelapparat geschüttelt und der Extinktionswert mit gelbem Filter gemessen. Dabei wurde das Volumen solange verdünnt (evtl. ein Teil der Lösung), bis der Extinktionswert E_{1g} wieder hergestellt war. So konnte das Endvolumen V_2 , das sich auf die ganze Menge Lösung bezieht, festgestellt werden. $V_2: V_1$ = Vermehrungsfaktor der Bakterien.

Jeweils 25 ccm Bakterienaufschwemmung mit dem Ausgangswert Ext. 0,8 (E_{1g}) sind dann zentrifugiert worden. Nach Abgießen des Überstandes wurde die Bakterienmasse mit 12 ccm Eisessig (99/100) aufgefüllt, 30 Min. im Schüttelapparat geschüttelt und unter öfterem Schütteln mit Hand bis zur Farblosigkeit der Bakterien stehen gelassen. Dann wurde wiederum 15 Min. lang zentrifugiert.

Der klare Überstand, Eisessig mit Farbstoff, wurde sodann im Lange-Photometer mit blauem Filter gemessen und der Extinktionswert als Maß für die Menge des entstandenen Farbstoffes registriert.

b) *Serratia marcescens*

Der untersuchte Stamm stammte aus der Sammlung des Tierhygienischen Institutes. Der Keim wurde zunächst auf gewöhnlichen Schrägagar, pH 7,2, geimpft und 48 Stunden bei Zimmertemperatur (20°C) stehen gelassen. Dann wurde eine Oese voll Keimmaterial in Nährbouillon gebracht und 24 Stunden im Brutschrank bei 28°C gezüchtet. Dieses flüssige Nährsubstrat wurde mit einer Oese auf festen Nährboden (gewöhnlicher Agar) gegeben und auf der ganzen Platte gut ausgestrichen. Die Petrischale wurde dann 6 Std. lang bei 28°C angebrütet und danach der Zimmertemperatur (20°C) ausgesetzt. Nach 48 Stunden konnte man sehr schöne Einzelkolonien von verschiedener Farbintensität beobachten.

Eine solche Kolonie, die ein kräftiges Zinnober aufwies, diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Untersuchungen.

Von jeweils 48-stündigen Schrägagarkulturen, die bei Zimmerwärme (20°C) gewachsen waren, wurde möglichst gleich viel Keimmaterial auf Agarplatten mit verschiedener Zusammensetzung des Nährbodens geimpft. Die Platten sind verschiedenen Temperaturen, dem diffusen Licht, sowie der Dunkelheit ausgesetzt worden.

Mit Hilfe einer Farbskala wurden die jeweiligen Farben der *Serratia*-Kolonien festgehalten. Danach sind sie in Tabellen zusammengestellt worden.

II. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

a) *Micrococcus aureus*, Versuchsreihe I, Glyzerinzusatz

Dem Nährboden (Verdauungsbouillon + Agar, pH 7.0) wurde Glyzerin in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, und zwar jeweils auf 100 ml Nährboden 0,2 mMol, 0,5 mMol, 1 mMol, 5 mMol und 10 mMol. Jede Platte enthielt stets 10 ml Nährboden. Dann wurden die Platten mit *Micrococcus aureus* beimpft, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, und zwei verschiedenen Bruttempera-

turen ausgesetzt (28°C und 37°C). Die Kulturen wurden 16 und 24 Stunden lang bebrütet, abgeschwemmt und weiter, wie bei der Methodik beschrieben, bearbeitet.

(In der Originalarbeit ist als Abb. 1 die Farbaufnahme einer normalen Plattenkolonie enthalten).

Bei der Messung im Lange-Photometer zeigte sich gegenüber dem Nährboden ohne Glycerin eine höhere Pigmentbildung nur bei einer Konzentration von 0,5 mMol Glycerin und zwar sowohl bei 28°C als auch bei 37°C . Größere Mengen von Glycerin (über 0,5 mMol) hemmten die Pigmentbildung. Siehe Abb. 2 und 3!

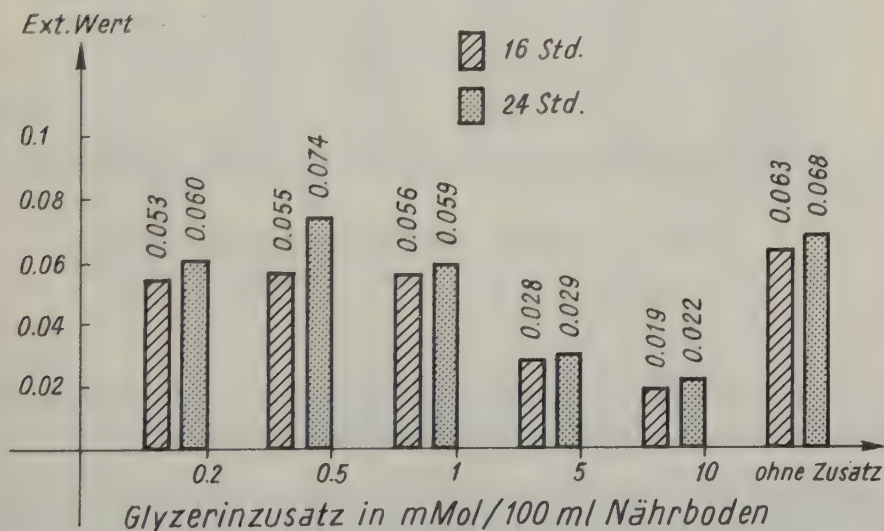


Abb. 2 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 28°C und Glycerin im Nährboden (pH 7,0)

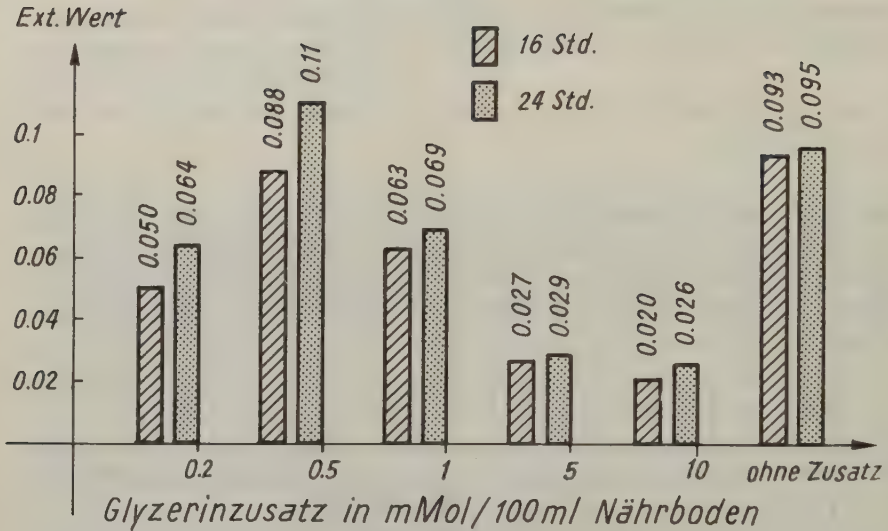


Abb. 3 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 37°C und Glycerin im Nährboden (pH 7.0)

Versuchsreihe II, Calcium-Glyzerinphosphat-Zusatz

Der Nährboden, Verdauungsbouillon + Agar, hatte ebenfalls einen pH von 7.0. Diesem Nährsubstrat wurde Calcium-Glyzerinphosphat in Mengen von 0,2 mMol, 0,5 mMol, 1 mMol, 5 mMol und 10 mMol pro 100 ml Nährboden zugesetzt.

Die Messungen ergaben einen konstanten Anstieg der Pigmentbildung gegenüber der Kontrolle mit Konzentrationen von Calcium-Glyzerinphosphat, die über 1 mMol betrugen. Bei einem Zusatz von 10 mMol betrug die Farbstoffbildung doppelt so viel wie bei der Kontrollplatte ohne Zusatz. Die fördernde Wirkung des Calcium-Glyzerinphosphates zeigte sich dabei sowohl bei Bebrütung von 28°C als auch von 37°C. Siehe Abb. 4 und 5!

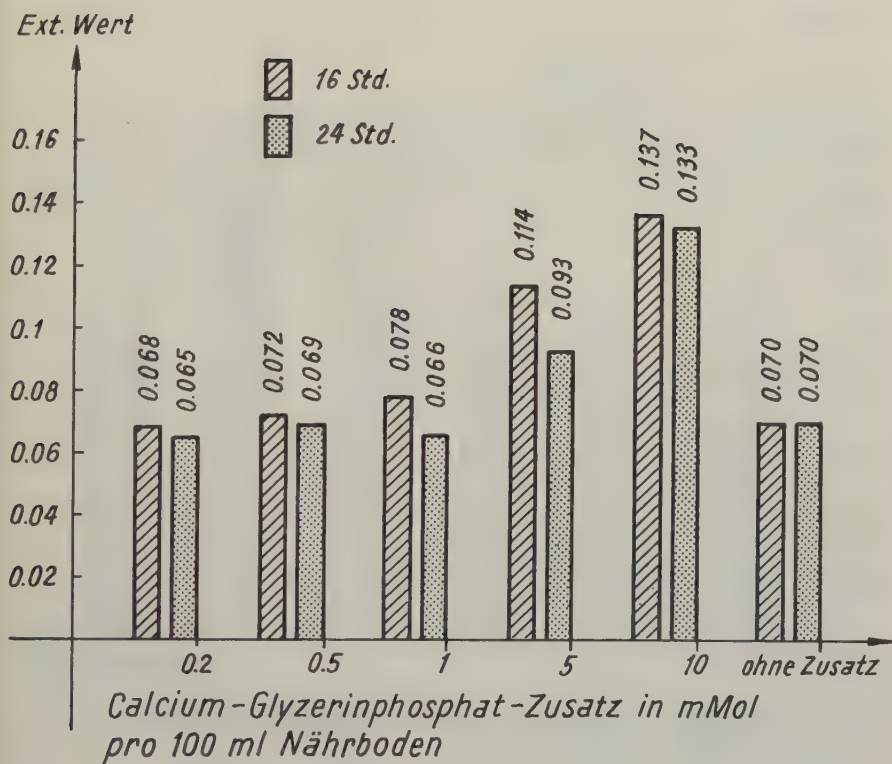


Abb. 4 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 28°C und Calcium-Glyzerinphosphat im Nährboden (pH 7.0)

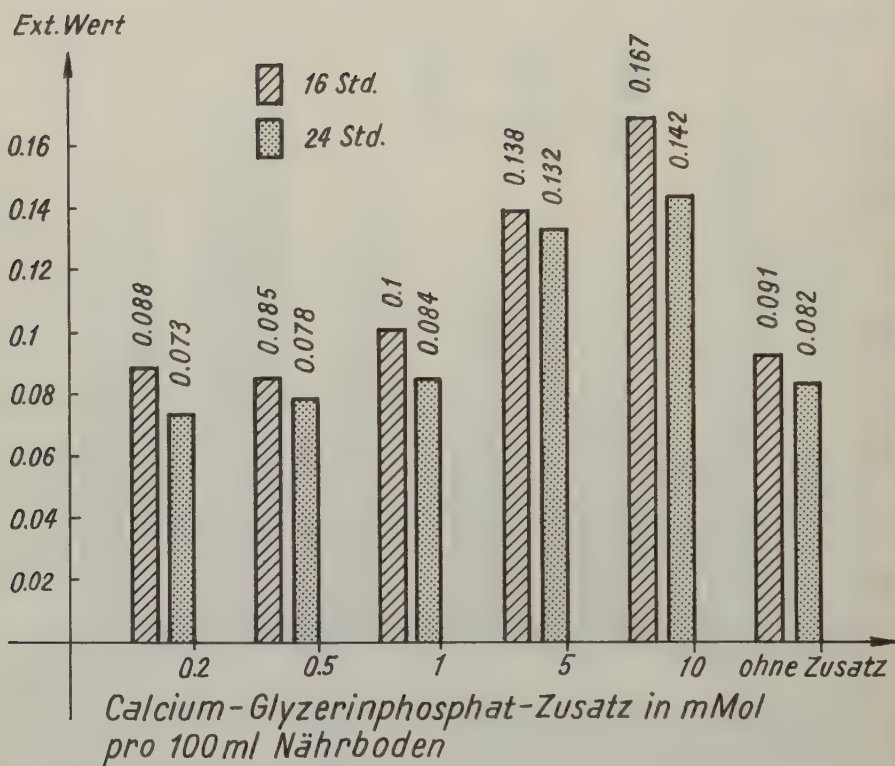


Abb. 5 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 37°C und Calcium-Glycerolphosphat im Nährboden (pH 7,0)

Versuchsreihe III, Kaliumphosphatzusatz (K_2HPO_4)

Gewöhnlichem Agarnährboden, pH 7.0, wurde Kaliumphosphat zugegeben. Die Mengen an K_2HPO_4 waren 0,2 mMol, 0,5 mMol, 1 mMol, 5 mMol und 10 mMol/100 ml Agar. Kolorimetrische Messungen ergaben eine beständige allerdings sehr geringe Abnahme der Farbstoffbildung mit höheren K_2HPO_4 -Zusätzen. Siehe Abb. 6 und 7!

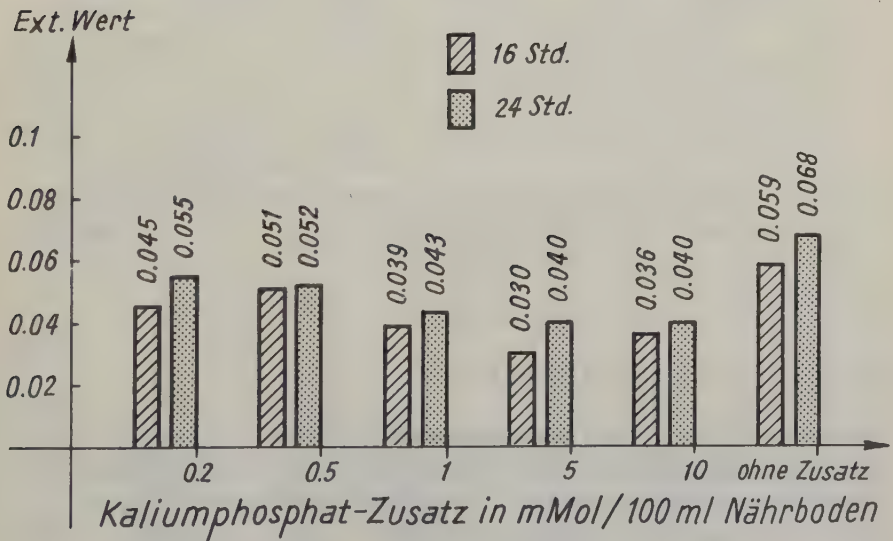


Abb. 6 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 28°C und Kaliumphosphat im Nährboden (pH 7.0)

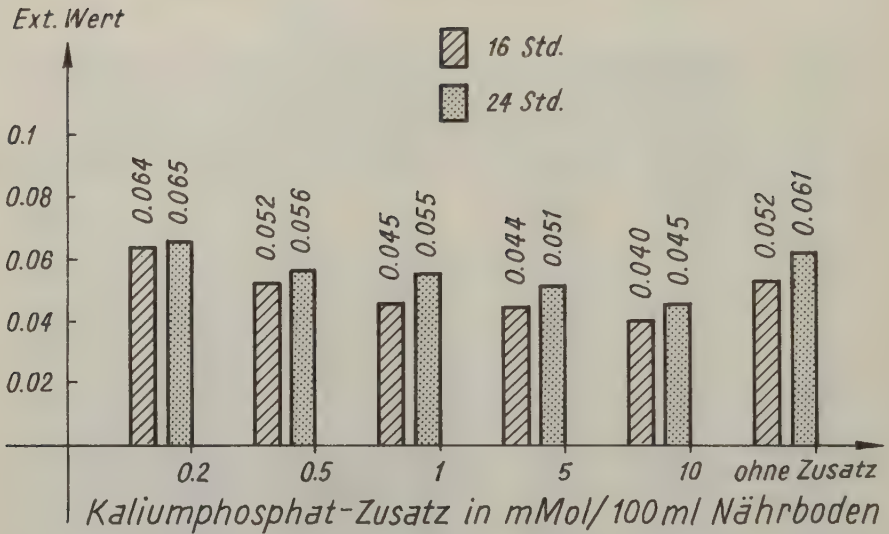


Abb. 7 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 37°C und Kaliumphosphat im Nährboden (pH 7.0)

Versuchsreihe IV, Vitaminzusatz

Ein weiterer Versuch wurde mit Vitaminzusätzen angestellt. Dabei ist dem normalen Agarnährboden, pH 7.0, Vitamin B₁ (Aneurin) und Vitamin B₂ (Laktoflavin) beigegeben worden. Die Zusätze betrugen jeweils $\frac{1}{1000}$ je 10 ml Nährboden.

Die Messungen im Lange-Photometer ergaben, daß Vitamin B₁ und Vitamin B₂ weder fördernd noch hemmend auf die Pigmentproduktion wirkten. Die Schwankungen bei den jeweiligen Messungen dürften wohl noch im Bereiche einer normalen Schwankungsbreite liegen.

Siehe Abb. 8, 9, 10 und 11!

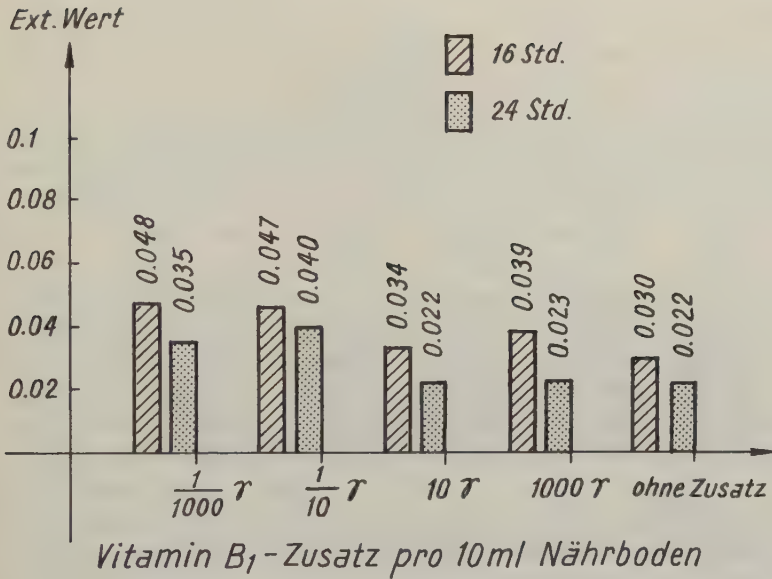


Abb. 8 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 28°C und Vitamin B₁ im Nährboden (pH 7.0)

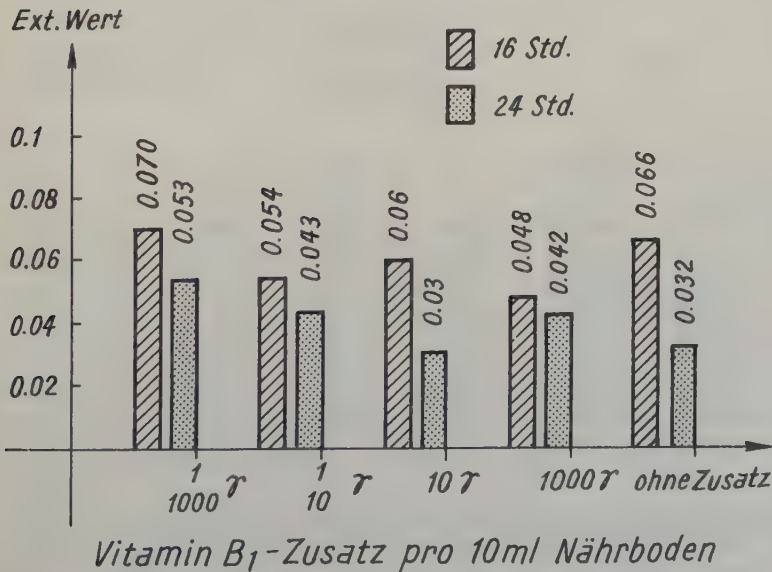


Abb. 9 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 37°C und Vitamin B₁ im Nährboden (pH 7.0)

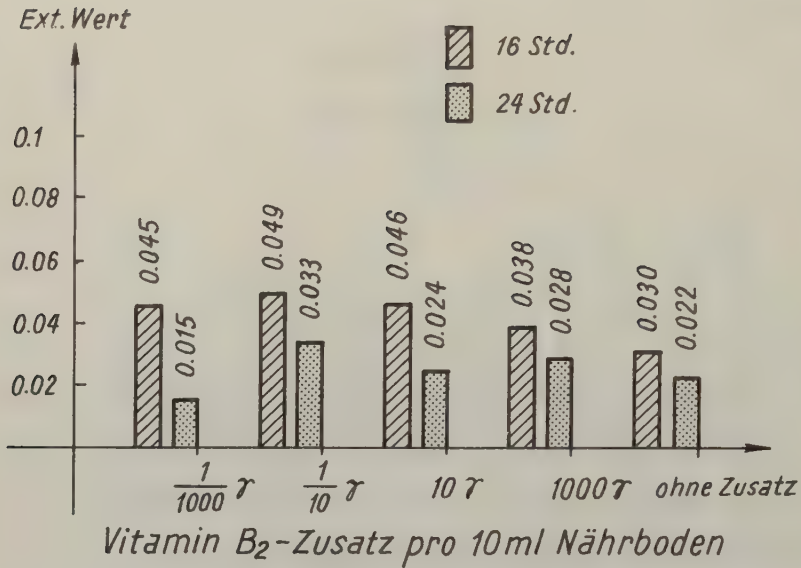


Abb. 10 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 28°C und Vitamin B₂ im Nährboden (pH 7.0)

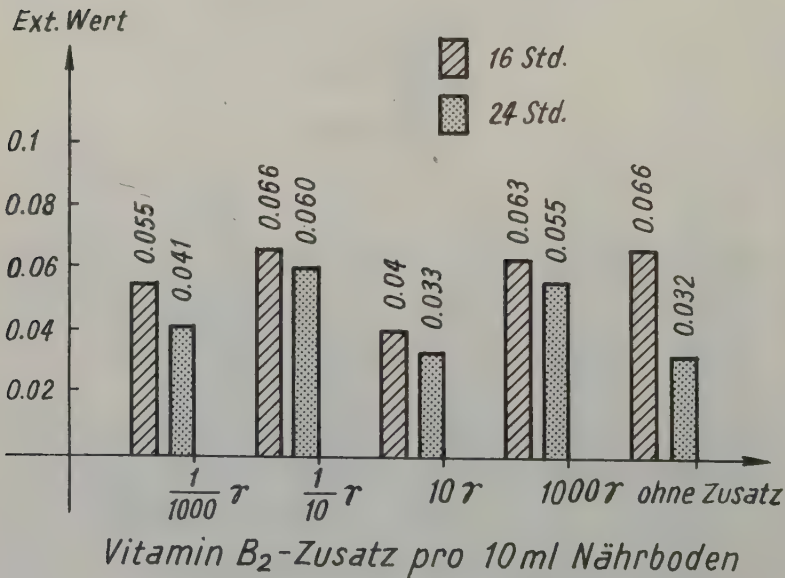


Abb. 11 Pigmentbildung von Micrococcus aureus bei 37°C und Vitamin B₂ im Nährboden (pH 7.0)

b) *Serratia marcescens* (Versuchsreihe I, Glyzerinzusatz)

Für *Serratia marcescens* sind die gleichen Nährsubstrate verwendet worden wie für *Micrococcus aureus*, nämlich gewöhnlicher Nähragar mit pH 7.0. Auch die Glyzerinzusätze waren die gleichen, und zwar 0,2 mMol, 0,5 mMol, 1 mMol, 5 mMol und 10 mMol je 100 ml Nährboden.

Wie schon im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, sind die Platten mit möglichst gleichen Keimmengen beimpft worden. Dann wurde ein Teil der Petrischalen im Brutschrank bei 28°C bzw. 37°C gehalten, ein anderer Teil dem diffusen Tageslicht bei Zimmertemperatur (20°C) ausgesetzt und ein weiterer Teil der Platten unter Lichtabschluß bei 20°C gezüchtet. Alle Aussaaten sind laufend beobachtet und die Farben stets festgehalten worden.

Wie aus den farbigen Abb. 12 und 13, die nur in der Originalarbeit enthalten sind, zu ersehen ist, wächst der "Prodigosus" bei Zimmertemperatur in sehr verschiedenen Farben, orange, zinnober, rosarot, karminrot, rot-violett, braun-rot. Ein wesentlicher Unterschied in den Farben bei Kulturen, die im diffusen Tageslicht und bei Lichtabschluß gewachsen sind, ist nicht festzustellen. Hingegen bewirkt der Glyzerinzusatz eine Abschwächung der Farbe bei Konzentrationen, die über 1 mMol liegen. Das ist besonders schön bei den Kulturen zu sehen, die unter Lichtabschluß gewachsen sind. Bei 37°C wächst der Keim farblos und bei 28°C (siehe Original Abb. 14!) zum Teil farblos und teils rosarot.

Versuchsreihe II, Calcium-Glyzerinphosphat-Zusatz

Normalem Agarnährboden, pH 7.0, wurden 0,2 mMol, 0,5 mMol, 1 mMol, 5 mMol und 10 mMol Calcium-Glyzerinphosphat/100 ml Nährboden zugegeben. Wachstum und Farbstoffbildung wurden bis zu 10 Tagen beobachtet. Zwischen Lichtabschluß und diffusem Tageslicht sind auch hier keine Unterschiede in der Farbintensität festzustellen. Doch ist die Farbe auf Nährböden ohne Zusatz kräftiger, als auf Calcium-Glyzerinphosphat-haltigen Nährsubstraten, und zwar nimmt die Farbintensität mit steigendem Gehalt an Calcium-Glyzerinphosphat ab. Siehe Original Abb 15 und 16! 28°C bringt größtenteils farblose Kolonien hervor. Bei einigen Platten ohne Zusatz und mit 0,5 mMol Calcium-Glyzerinphosphat stellten sich nach 7 Tagen auf etwa 1/4 der Platten farbige Kolonien ein, die zinnober, karminrot und rot-violett wuchsen. Als Besonderheit möchte

ich noch erwähnen, daß bei allen Aussaaten mit 5 und 10 mMol Calcium-Glyzerinphosphat-Zusatz auf einem farblosen Rasen einzelne farbige Kolonien wuchsen. Diese waren am 2. Tage rosa, änderten sich dann in zinnober, karminrot, und waren am 10. Tage rot-violett. Siehe Original Abb. 17! Bei 37°C fanden sich neben rosa-weißlichen Kolonien nur farblose. Siehe Original Abb. 18!

Versuchsreihe III, Kaliumphosphatzusatz (K_2HPO_4)

Dem Nährsubstrat (Verdauungsbouillon + Agar, pH 7.0) wurde Kaliumphosphat in verschiedenen Konzentrationen beigegeben, 0,2 mMol, 0,5 mMol, 1 mMol, 5 mMol und 10 mMol pro 100 ml Nährboden. Die beimpften Petrischalen wurden wiederum im Brutschrank und bei Zimmertemperatur (mit und ohne Licht) gehalten. Bei Zimmertemperatur wächst der "Prodigosus" orange, zinnober und braun-rot. Die Unterschiede in der Farbintensität zwischen Kulturen, die bei den verschiedenen Kaliumphosphatzusätzen sowie mit und ohne Licht gewachsen sind, sind unwesentlich. Siehe Original Abb. 19 und 20!

Bei 28°C wächst der Keim farbig, und zwar wird die Farbe mit steigendem Gehalt an Kaliumphosphat kräftiger. So weist er z.B. bei Zusatz von 10 mMol Kaliumphosphat ein kräftiges Zinnober und Braun-rot auf, wohingegen er ganz ohne Zusatz im Nährsubstrat nur orange und rosarot wächst. Siehe Original Abb. 22!

Versuchsreihe IV, Vitaminzusatz

Bei der 4. Versuchsreihe wurden dem Nährboden Vitamin B_1 (Aneurin) und Vitamin B_2 (Laktoflavin) zugesetzt, jeweils $\frac{1}{1000}$ γ, $\frac{1}{10}$ γ, 10 γ und 1000 γ pro 10 ml Nährmedium.

Die Beobachtung erfolgte bis zu 9 Tagen. Bei Zimmertemperatur wächst der "Prodigosus" mit einem kräftigen Rot (zinnober bis braunrot). Ein Unterschied in der Farbe bei Kulturen, die mit und ohne Licht gewachsen sind, konnte nicht festgestellt werden. Ebenso besteht auch keine Abweichung in der Farbintensität zwischen Keimen, die auf Nährsubstraten ohne und mit Vitaminzusatz gewachsen sind. Siehe Original Abb. 23 und 24!

Bei 28°C wächst der Keim schwach bis kräftig rosa. Auch hier gibt es keinen Unterschied auf Nährböden mit und ohne Vitaminzusatz. Bei 37°C wächst die *Serratia marcescens* bei Vitamin B₁-Zusatz nur farblos, während Vitamin B₂-Zusatz einzelne weißlich-rosa Kolonien hervorbringt, ebenso wie dies bei Nährböden ohne Zusatz der Fall ist. Siehe Original Abb. 26 u. 26!

Versuchsreihe V

Es wurden Nährböden mit Magnesiumsulfat-Zusatz von 0,1 mMol, 1 mMol und 10 mMol/100 ml Nährsubstrat (pH 7,5) beimpft und 4 Tage lang einer Zimmertemperatur von 20°C ausgesetzt. Das "*Bacterium prodigiosum*" zeigte auf diesem Nährmedium ein Zinnober, das trotz verschiedener MgSO₄-Konzentrationen auf allen Platten gleich kräftig war und sich von der Pigmentbildung auf normalem Agarnährboden nicht unterschied. Fachphotos in der Originalarbeit enthalten Abb. 27-33!

III. DISKUSSION

a) *Micrococcus aureus*

Micrococcus aureus wurde auf Agar-Nährböden mit verschiedenen Zusätzen gezüchtet. Die dabei entstandene Farbstoffmenge wurde kolorimetrisch festgestellt.

Vorliegende Untersuchungen haben ergeben, daß bei einem Glyzerinzusatz von 0,5 mMol/100 ml Nährboden die Pigmentbildung relativ gesteigert wird und bei stärkeren Konzentrationen eine deutliche Hemmung in der Farbstoffbildung eintritt. Aber auch bei einem Glyzerinzusatz von weniger als 0,5 mMol/100 ml Nährboden war die Pigmentbildung im Vergleich zu den Werten der Kontrollplatten ohne Zusatz bereits leicht vermindert. Es scheint daher, daß im Grunde dem Glyzerin keine fördernde, sondern nur eine hemmende Wirkung bei der Farbstoffproduktion zukommt, eine Erscheinung, die auch von St e u e r 1956, und G a z z e t t i 1911, beobachtet worden ist.

Anders dagegen verhält es sich bei Calcium-Glyzerinphosphat-Zusätzen. Der geringste Zusatz von 0,2 mMol läßt noch keine Steigerung in der Pigmentpro-

duktion erkennen, doch schon bei 0,5 mMol macht sich ein leichter Anstieg bemerkbar, der mit steigender Konzentration an Calcium-Glyzerinphosphat immer mehr zunimmt. Bei Zusatz von 10 mMol wird gegenüber den Kontrollplatten etwa die doppelte Farbstoffmenge gebildet. Hier scheint das Phosphat in den Stoffwechsel der Bakterien einzutreten und eine Steigerung der Farbstoffbildung zu veranlassen. Schon S u l l i v a n 1905, hat mit Phosphaten recht gute Erfolge erzielt.

Kaliumphosphat-Zusätze bewirkten im Gegensatz dazu eine beständige, geringe Abnahme in der Farbstoffbildung. Der größte Zusatz an K_2HPO_4 ergibt den geringsten Ausschlag im Kolorimeter. Zunächst würde man geneigt sein, diese Tatsache einem veränderten pH-Wert des Nährbodens zuzuschreiben, den dieser durch Zugabe von Kaliumphosphat erfährt. Doch dürfte der pH-Wert nicht über 7,5 hinausgehen und das fiel noch in einen pH-Bereich, in dem z.B. O b i g e r 1957, keine Unterschiede im Farbstoffbildungsvermögen bei Streptokokken feststellen konnte. R e i d 1936, gibt als Reaktionsoptimum bei *Micrococcus aureus* sogar 6,6 bis 8,0 an.

Zusätze von Vitamin B₁ und B₂ hatten keinen Einfluß auf Farbstoffbildung des *Micrococcus aureus*. Nach S t o c k e r 1955, war zwar Aneurin (Vitamin B₁) imstande, die Bildung eines roten Farbstoffes bei Kokken zu veranlassen, die er als Ursache eines im Innern rotgefärbten Romadurkäses feststellte. Bei den Untersuchungen mit *Micrococcus aureus* wurden Vitamin B₁ und Vitamin B₂ in Mengen von $\frac{1}{1000}$ γ, $\frac{1}{10}$ γ, 10 γ und 1000 γ zugegeben. Diese Mengen, die im Bereich der von S t o c k e r gegebenen Zusätze lagen, bewirkten aber keine Verbesserung in der Farbstoffbildung. Messungen im Lange-Kolorimeter zeigen Werte an, die über eine normale Streubreite nicht hinausgehen. Besonders auffällig ist hierbei, daß das Wachstum im umgekehrten Verhältnis zur Farbstoffbildung steht, wie schon N o e s s k e 1900, festgestellt hat. Es schien, als ob die Pigmentbildung mit der Intensität der Keimentwicklung abnahm.

b) *Serratia marcescens*

Die Farbstoffbildung von *Serratia marcescens* wurde an Hand einer Farbskala festgelegt und in Farbtabelle zusammengestellt. Es zeigte sich, daß Kulturen, die im diffusen Tageslicht und bei Lichtabschluß gezüchtet wurden, keinen signifikanten Unterschied in der Farbtintensität aufwiesen. Die Befunde von

Schroeter 1872, und Wernich 1879, werden damit bestätigt.

Bei Glyzerin-Zusätzen konnte bis zu einer Konzentration von 1 mMol pro 100 ml Nährboden bei Zimmertemperatur die gleiche Farbstärke festgestellt werden wie bei der Kontrollplatte ohne Zusatz von Glyzerin. Bei stärkeren Konzentrationen an Glyzerin nahm die Intensität des roten Pigmentes ab, die Keime zeigten nur eine kräftig rosa bis blaßrosa Farbe. Die Pigmentbildungsfähigkeit wurde also durch Glyzerinzusätze über 1 mMol gehemmt. Bei 28°C jedoch ließen Glyzerinzusätze auch in höheren Dosen keine Hemmung erkennen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Befunden von Abramowicz 1953, der einem Glyzerinzusatz bis zu 2 % eine fördernde Wirkung zusprach.

Calcium-Glyzerinphosphat scheint bei 20°C ebenfalls die Pigmentbildung zu hemmen, denn mit stärkeren Konzentrationen wächst der "Prodigosus" blasser. Bei 28°C dagegen konnte bei Calcium-Glyzerinphosphat-Zusätzen über 1 mMol eine Steigerung der Farbintensität festgestellt werden.

Kaliumphosphat läßt bei 20°C bei *Serratia marcescens* keine Unterschiede in der Farbintensität gegenüber den Kontrollplatten erkennen. Bei 28°C sind die Farben bei höheren Konzentrationen jedoch kräftiger als die entsprechenden Kontrollplatten.

Ein Zusatz von Vitamin B₁ und B₂ bleibt auf die Farbstoffbildung dieser Keimart ohne Einfluß, sowohl bei 20°C als auch bei 28°C.

D. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei je einem Stamm von *Micrococcus aureus* und *Serratia marcescens* wurde der Einfluß von Licht, Bebrütungstemperatur und Nährbodenzusammensetzung auf die Pigmentbildung untersucht.
2. Die Bildung des Zeaxanthins, des gelben Farbstoffes von *Micrococcus aureus*, wurde kolorimetrisch nach Extraktion mit Eisessig bestimmt. Die Bildung des Prodigiosins, des roten Farbstoffes von *Serratia marcescens*, wurde optisch an Hand von selbst hergestellten Farbskalen verfolgt.
3. Bei *Micrococcus aureus* wirkte sich der Zusatz von Glycerin und Kaliumphosphat hemmend, der Zusatz von Calcium-Glycerinphosphat fördernd auf die Pigmentbildung aus. Der Zusatz von Vitamin B₁ (Aneurin) und Vitamin B₂ (Laktoflavin) im Bereich von $\frac{1}{1000}$ bis 1000 pro 10 ml Nährboden beeinflusste die Pigmentbildung nicht.
4. Bei *Serratia marcescens* bewirkte der Zusatz von mehr als 1 mMol Glycerin bzw. Calcium-Glycerinphosphat/100 ml Nährboden bei Zimmertemperatur eine Hemmung der Pigmentbildung. Durch Bebrütung bei 28°C wurde dieser Effekt aufgehoben. Zusatz von Kaliumphosphat beeinflusste bei Zimmertemperatur die Farbstoffbildung nicht, verstärkte sie jedoch bei 28°C.
Diffuses Tageslicht sowie Magnesiumsulfat, Vitamin B₁ und B₂-Zusätze zum Nähragar wirkten sich auf die Bildung des Prodigiosins weder hemmend noch fördernd aus.
Auf gewöhnlichem Nähragar kam es nach Bebrütung bei 20°C stets zur stärksten Pigmentbildung. Bei 28°C wurde die Farbstoffbildung leicht gehemmt, bei 37°C nahezu vollkommen unterdrückt.

E. SCHRIFTTUM

1. Abramowicz, H. Untersuchungen über den Einfluß der Wachstumsstärke, der Wasserstoffionenkonzentration, des Lichtes, des Glycerinzusatzes, der Züchtungstemperatur und das Verhältnis von toten und lebenden Bakterien auf die Farbstoffbildung durch *Serratia marcescens*. Diss. Gießen 1953.
2. Amako, T.H. Beiträge zur Kenntnis der Farbstoffbildung des *Bacillus prodigiosus*. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 116, 494 (1930).
3. Amako, T.H. Über den Einfluß des Immunserrums auf die Lebenserscheinungen der Bakterien. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 116, 506 (1930).
4. Beck, M. und Schultz, P. Über die Einwirkung sogen. monochromatischen Lichtes auf die Bakterienentwicklung. Z. Hyg. 23, 490 (1896).
5. Bergmann, E. Die chemische Erforschung der Naturstoffe. I. Ergeb. Physiol. 35, 158 (1933).
6. Beyerinck, M. W. Die Lebensgeschichte einer Pigmentbakterie. Bot. Ztg. 49, 605 (1891).
7. Bolle, A. Vergl. biochem. Untersuchungen eines antibioticaempfindl. (*Staph. aureus* Londres) mit einem resistenten Stamm (*Staph. "Leg"*). Ann. Inst. Pasteur 88, 258 (Paris 1955).
8. Buchner, H. Über den Einfluß des Lichtes auf Bakterien. I. Zbl. Bakt. I. Orig. 11, 781 (1892).
9. Buchner, H. Über den Einfluß des Lichtes auf Bakterien. II. Zbl. Bakt. I. Orig. 12, 217 (1892).

10. Bunting, M.J. The inheritance of color in bacteria, with special reference to *Serratia marcescens*.
Ber.üb.d.wiss.Biologie 64, 343 (1949).
11. Chargaff, E. Chimie Biologique - Sur les carotinoides des bactéries.
Compt.rend. 197, 946 (1933).
12. Chargaff, E. Etude des pigments caroténoides de quelques bactéries.
Ann. Inst. Pasteur 52, 415 (1934).
13. Cohn, F. Untersuchungen über Bakterien.
Cohn's Beitr. z.Biolog.d.Pflanz. 1, 127 (1872).
14. Dieudonné, A. Beiträge zur Beurteilung der Einwirkung des Lichtes auf Bakterien.
Arb. aus d.Kaiserl.Gesundheitsamt, S.405 (1894).
15. Eisenberg, Ph. Über den Variationskreis des *B.prodigiosum* und *B.violaceum*.
Zbl.Bakt. I. Orig. 73, 449 (1914).
16. Eisler, M. und Jacobsohn, I. Über die antagonistische Wirkung steriler Bouillonextrakte aus *Bacterium prodigiosus*.
Z. Hyg. 117, 76 (1925).
17. Fink, H. und Zenger, E. Über die Farbstoffe einer roten Hefe.
Wschr.Brauerei 51, 89 (1934).
18. Frank Gibt es nur einen *Prodigiosus*?
Zbl.Bakt.I. Orig. 132, 78 (1934).
19. Füchtbauer, H. Zur Strahlenresistenz pigmentierter Bakterien.
Diss. Göttingen 1950.
20. Gazzetti, C. Biologische Wirkung des den Nährsubstraten zugesetzten Glycerins auf einige chromogene

Keime, mit besonderer Berücksichtigung der Farbstoffherstellungsfunktion.
Zbl. Bakt. I. Orig. 60, 588 (1911).

21. Geisler, Th. Zur Frage über die Wirkung des Lichtes auf Bakterien.
Zbl. Bakt. 11, 161 (1892).
22. Griffiths, A.B. Sur la matière colorante du *Micrococcus prodigiosus*.
Compt. rend. de l' Acad. de Sci. CXV, 321 (1892).
23. Hefferan, M. A comparative and experimental study of bacilli producing red pigment.
Zbl. Bakt. 2. Abt. 11, 311 (1904).
24. Hettche, H.O. Untersuchungen über die bakteriziden und anthrakozyden Bestandteile von *Bacillus pyocyaneus* und *Bacillus prodigiosus*.
Arch. Hyg. 107, 337 (1932).
25. Kaplan, R.W. Die Beeinflussung des Mutationseffektes bei *Bacterium prodigiosum* durch die Gasatmosphäre während oder nach der Bestrahlung mit kurzwelligem Ultraviolett.
Arch. Mikrobiol. 18, 210 (1953).
26. Kotljar, E. Zur Frage über den Einfluß des Lichtes auf Bakterien.
Zbl. Bakt. I. Orig. 12, 836 (1892).
27. Kraft, E. Beiträge zur Biologie des *Bacterium Prodigiosum* und zum chemischen Verhalten seines Pigmentes.
Diss. Würzburg 1902.
28. Krause, P. Beiträge zur Kenntnis des *Bacillus pyocyaneus*,
Zbl. Bakt. I. Abt. 27, 769 (1900).
29. Kreitlow, K.W. Some effects of visible radiation on pigmentation of *Serratia marcescens*.
Zbl. Bakt. I. Abt. Ref. 141, 233 (1942).

30. Kübler, P. Über das Verhalten des *Micrococcus prodigiosus* in saurer Fleischbrühe.
Zbl. Bakt. 5, 333 (1889).
31. Kuhn, R. und Brockmann, H. Bestimmung von Carotinoiden.
Z. Physiol. Chem. 206, 41 (1932).
42. Kuntze, W. Ein Beitrag zur Kenntnis der Bedingungen der Farbstoffbildung des *Bacillus prodigiosus*.
Z. Hyg. 34, 169 (1900).
43. Kunze, W. Weitere Bemerkungen zur Farbstoffbildung des *Bacillus prodigiosus*.
Zbl. Bakt. I. Orig. 44, 299 (1907).
44. Laurent, E. Etude sur la variabilité du *Bacille rouge* de Kiel.
Ann. Inst. Pasteur, 4, 465 (1890).
45. Lehmann, K.B. und Neumann, R.O. Atlas und Grundriß der Bakteriologie. München 1904.
46. Liborius, P. Beiträge zur Kenntnis des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien.
Z. Hyg. 1, 115 (1886).
47. Lubinski, W. Über die Anaerobiose bei der Eiterung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 16, 769 (1894).
48. Luckhardt, A.E. Über Variabilität und Bedingungen der Farbstoffbildung bei Spaltpilzen.
Diss.-Ref. in Baumgartens Jahresber. 17, 804 (1901).
49. Marx, H. Bakteriologische Mitteilungen.
Arch. Klin. Chirurgie, 62, 346 (1900).
50. Migula, W. System der Bakterien II, Jena, 1900.

51. Milburn, Th. Über Änderungen der Farben bei Pilzen und Bakterien.
Zbl. Bakt. 2. Abt. Orig. 13, 129 (1904).
52. Moycho, W. Formation du pigment chez *Bacterium prodigiosum*.
Compt. rend. Acad. de Sci. 191, 497 (1930).
53. Müller, R. Medizinische Mikrobiologie München-Berlin 1950.
54. Nakanishi, K. Über den Bau der Bakterien.
Zbl. Bakt. I. Abt. 30, 97 (1901).
55. Neisser, M. Die Staphylokokken.
Hdbch. d. pathog. Mikroorg. 1. Teil, 4, 446 (1928).
56. Neumann, R. Studien über die Variabilität der Farbstoffbildung bei *Staphylococcus pyogenes aureus* und einigen anderen Spaltpilzen.
Arch. Hyg. 30, 1 (1897).
57. Noesske, H. Neue Untersuchungen über den *Bacillus pyocyaneus* und die Gesetze der Farbstoffbildung.
Arch. Klin. Chirurgie, 61, 266 (1900).
58. Noguchi, Y. Über die Farbstoffproduktion und Pathogenität der Staphylokokken.
Arch. Klin. Chirurgie, 96, 696 (1911).
59. Novelli, A. Faktoren, die die Pigmentation des *Bac. prodigiosum* beeinflussen. Die Rolle von Eisen und Pyrrol-Verbindungen.
Zbl. Bakt. 1. Abt. Ref. 153, 298 (1954).
60. Obiger, G. Über die Pigmentbildung bei Gruppe B-Stämmen (*Sc. agalactiae*).
Milchwiss. 12, 422 (1957).
61. Raum, J. Der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse über den Einfluß des Lichtes auf Bakterien und auf den tierischen Organismus. Z. Hyg. 6, 312 (1889).

62. Reed, G. B. und Rice, C. E. The Influence of Iron on the Pigmentation of acid-fast Bacteria.
J. Bacter. 17, 407 (1929).
63. Reid, R. D. Studies on Bacterial Pigmentation.
Zbl. Bakt. II. Abt. 95, 379 (1936).
64. Rolle, M. Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre,
Stuttgart 1958.
65. Rosenberg, W. W. Beiträge zur Kenntnis der Bakterienfarbstoffe insbesondere der Gruppe des Bact. prodigiosum.
Diss. Würzburg 1899.
66. Samkow, S. Zur Physiologie des Bacillus prodigiosus.
Zbl. Bakt. II. Abt. 11, 305 (1903).
67. Solm, R. Zur Mutation des Bacillus prodigiosus.
Diss. Leipzig 1923.
68. Sullivan, M. X. Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments.
J. Med. Res. 14, 109 (1905).
69. Scheurlen. Geschichtliche und experimentelle Studien über den Prodigiosus.
Arch. Hyg. 26, 1 (1896).
70. Schneider, P. Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die Unterscheidung der Arten. Diss. Basel 1894.
71. Schottelius, M. Biologische Untersuchungen über den Mikrokokkus prodigiosus.
Zbl. Bakt. 2, 439 (1887).
72. Schroeter, J. Über einige durch Bakterien gebildete Pigmente, Cohn's Beitr. z. Biolog. d. Pflanz. 1, 109 (1872).

73. Steuer, W. Untersuchungen über die Pigmentbildung von
Micrococcus pyogenes.
Zbl.Bakt. I.Orig. 167, 210 (1956).
74. Stocker, W. Eine Rotfärbung des Käseteiges.
Milchwiss. 10, 324 (1955).
75. Wasserzug, E. Variations de forme chez les bactéries.
Zbl.Bakt. 3, 783 (1888).
76. Wernich, A. Versuche über die Infektion mit Micrococcus
prodigiosus.
Cohn's Beitr.z. Biol.d. Pflanz. 3, 105 (1879)-
77. Williams, R.P. Symposium on bacterial pigments.
Bact.Rev. 20, 282 (1956).
78. Wilson, G.S. und Miles, A.A. Topley and Wilson's Principles of
Bacteriology and Immunity. I, London 1955.
79. Wrede, F. Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des
Bacillus prodigiosus.
Z. Hyg. 111, 531 (1930).
80. Wrede, F. Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des
Bacillus prodigiosus. II.
Z. Physiol. Chemie, 210, 125 (1932).
81. Wrede, F. und Hettche, O. Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff
des Bacillus Prodigiosus. I.
Ber.d. Deutsch. Chem. Ges. 62, 2, 2678 (1929).
82. Wrede, F. und Rothhaas, A. Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff
des Bacillus prodigiosus. III.
Z. Physiol. Chemie, 215, 67, (1933).
83. Wrede, F. und Rothhaas, A. Über das Prodigiosin, den roten Farbstoff des
Bacillus prodigiosus. IV.
Z. Physiol. Chemie, 219, 267 (1933).

84. Zopf, W. Über Pilzfarbstoffe.
Bot. Zeitg. 47, 54 (1889).
85. Zopf, W. Über das mikrochemische Verhalten von Farbstoffen und Fettfarbstoff-haltigen Organen.
Z.f.wiss. Mikroskopie, 6, 172 (1889).
86. Zopf, W. Über Ausscheidung von Fettfarbstoffen (Lipochromen) seitens gewisser Spaltpilze.
Ber.d.Deutsch.Bot.Ges. 9, 22 (1891).

Herrn Prof. Dr. M e y n danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas.

Auch möchte ich Herrn Dr. S c h l i e s s e r für die freundlichen Ratschläge und die immer bereitwillige Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank sagen.

LEBENS LAUF

Als Tochter der Eheleute Adolf und Anna Goerigk wurde ich am 1. Juli 1922 in Rothfließ, Kreis Rößel geboren.

Meine Schulzeit verbrachte ich in Bischofsburg (Ostpr.) und später in Hamburg, wo ich im Herbst 1953 an der "Abendoberschule" das Reifezeugnis erlangte.

Im Wintersemester 1953/54 wurde ich an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover immatrikuliert. Insgesamt studierte ich 4 Semester in Hannover, 1 Semester an der Universität Zürich/Schweiz, vet.med.Fakultät, und 4 Semester an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München, wo ich im Herbst 1958 das Staatsexamen ablegte.

